



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***“Purificación, clonación y expresión de inhibidores peptídicos  
de proteasas de potencial aplicación biomédica a partir de  
Solanum tuberosum spp.”***

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

---

***Tesista: Mariana Edith Tellechea***

***Director: Walter David Obregón***

***Codirector: Sebastián Martín Tanco***

***Año: 2017***



# Agradecimientos

A mis padres, Celia y Néstor.

A mis hermanos, Mercedes, Heber y Aitor.

A mi familia.

A mis amigos.

A mis amigos del laboratorio.

A mis amigos del IBB.

A David Obregón.

A Sebastián Tanco.

A Silvia Bronsoms.

A Javi.

A Julia Lorenzo

A Xavier Avilés

A Tom Blundell

A Sony Malhotra

A la Facultad de Ciencias Exactas.

A la Universidad Nacional de La Plata.





# Índice de contenidos

---



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abreviaturas.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>Prólogo.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>Introducción.....</b>  | <b>23</b> |
| I.1 Productos naturales en biomedicina.....   | 25        |
| I.2 Proteasas.....  | 26        |
| I.2.1 Especificidad de sustrato de las proteasas y su terminología.....   | 27        |
| I.2.2 Clasificación de las proteasas.....   | 28        |
| I.2.3 Metalocarboxipeptidasas.....  | 30        |
| I.3 Inhibidores de proteasas.....   | 31        |
| I.3.1 Clasificación de los inhibidores de proteasas.....  | 32        |
| I.3.2 Inhibidores de metalocarboxipeptidasas.....   | 35        |
| I.3.3 Mecanismo de inhibición de las metalocarboxipeptidasas.....   | 35        |
| I.3.4 Inhibidores de proteasas en plantas.....  | 38        |
| I.3.5 Aplicaciones potenciales de los inhibidores de proteasas.....   | 42        |
| I.4 Miniproteínas de tipo <i>knot</i> .....   | 44        |
| I.4.1 Miniproteínas naturales.....  | 46        |
| I.5 El plegamiento de proteínas y la formación de puentes disulfuro.....  | 47        |
| I.5.1 Plegado oxidativo.....  | 48        |
| I.6 Importancia de la inmovilización de enzimas.....  | 49        |
| I.6.1 Inmovilización de proteasas para captura de inhibidores peptídicos<br>.....                                 | 50        |
| I.7 Importancia de la proteómica para el estudio de enzimas e inhibidores.....                                    | 51        |
| <b>Objetivos.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>Materiales y métodos.....</b>  | <b>57</b> |
| M.1 Material vegetal.....   | 59        |
| M.2 Preparación de los extractos crudos.....  | 61        |
| M.3 Cuantificación proteica por el método de Bradford (Bradford 1976).....  | 62        |
| M.4 <i>Screening</i> o búsqueda de actividades inhibitorias de proteasas de<br>diferentes tipos mecanísticos..... | 63        |
| M.4.1 Determinación de actividad inhibitoria de tripsina.....   | 63        |

|   |    |
|---|----|
| M.4.2 Determinación de actividad inhibitoria de papaína.....  | 64 |
| M.4.3 Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.....   | 64 |
| M.4.4 Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina.....  | 65 |
| M.5 Determinación de IC50: curva dosis-respuesta.....   | 66 |
| M.6 Tratamiento térmico del extracto crudo.....   | 66 |
| M.7 Método para concentración de proteínas: liofilización.....  | 67 |
| M.8 Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa.....   | 68 |
| M.9 Purificación cromatográfica de inhibidores de CPA desde el EC.....  | 71 |
| M.10 Electroforesis de Alta Resolución con Tris-Tricina (AR SDS-Tricina-PAGE).....  | 71 |
| M.10.1 Transferencia a membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF).....   | 76 |
| M.11 Isoelectroenfoque.....   | 77 |
| M.12 Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF).....   | 81 |
| M.12.1 Métodos proteómicos.....   | 82 |
| M.12.2 Intensity Fading (IF) por MALDI-TOF MS.....  | 82 |
| M.12.3 Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprinting).....  | 84 |
| M.13 Secuenciación mediante EDMAN.....  | 86 |
| M.14 Métodos de biología molecular.....   | 86 |
| M.14.1 Aislamiento de ARN a partir de material vegetal.....   | 86 |
| M.14.2 Obtención de ADNc: (3'RACE PCR).....   | 87 |
| M.14.3 Obtención de la secuencia de un inhibidor de carboxipeptidasa A.....   | 87 |
| M.14.4 Construcción de pIN-III-OmpA3-PCI Chu.....   | 88 |
| M.14.5 Construcción de un potencial inhibidor determinado a partir de la secuenciación mediante la técnica de EDMAN: StcCI..... | 91 |
| M.14.6 Construcción de la variante del StcCI: 5N-StcCI.....   | 93 |
| M.15 Expresión de las proteínas recombinantes: PCI-Chu, StcCI y 5N-StcCI.....   | 95 |
| M.15.1 Plegado (folding) de proteínas.....  | 96 |
| M.16 Purificación de PCI Chu, StcCI y 5N-StcCI.....   | 96 |
| M.17 Estudio del plegado (folding) oxidativo de proteínas.....  | 97 |
| M.18 RP HPLC.....   | 97 |
| M.19 Bioinformática.....  | 98 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>CAPÍTULO 1: SCREENING PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PROTEÓMICA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.....</b>   | <b>101</b> |
| 1.1 Obtención del Extracto Crudo y purificación preliminar.....  | 103        |
| 1.2 Screening de inhibidores: actividad inhibitoria de la muestra frente a proteasas de distintos tipos mecanísticos.....                                      | 104        |
| 1.2.1 Inhibición de carboxipeptidasa A (CPA).....  | 105        |
| 1.2.2 Inhibición de papaína.....   | 105        |
| 1.2.3 Inhibición de subtilisina.....   | 106        |
| 1.2.4 Inhibición de tripsina.....  | 107        |
| 1.3 Resumen del “ <i>screening</i> ” de la evaluación de las actividades inhibitorias del EC de churqueña frente a proteasas de distinto tipo mecanístico..... | 108        |
| 1.4 Aislamiento y caracterización de inhibidores de carboxipeptidasa A.....  | 110        |
| 1.4.1 Curva dosis-respuesta del Extracto Crudo frente a CPA .....  | 110        |
| 1.4.2 Efecto de tratamientos térmicos.....   | 111        |
| 1.4.2.1 Actividad inhibitoria de CPA frente a los diferentes tratamientos térmicos.....  | 112        |
| 1.4.2.2 Perfil electroforético del EC y los tratamientos térmicos de Churqueña.....  | 113        |
| 1.4.2.3 Estimación del punto isoelectrico.....   | 114        |
| 1.4.2.4 Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS del EC y las muestras tratadas térmicamente.....  | 116        |
| 1.5 Diseño de matrices empleadas para el desarrollo de cromatografía de afinidad.....  | 119        |
| 1.6 Intensity-fading MALDI-TOF MS.....   | 120        |
| 1.7 Purificación de inhibidores mediante cromatografía de afinidad.....  | 123        |
| 1.7.1 Determinación del peso molecular del inhibidor obtenido por cromatografía de afinidad.....   | 124        |
| 1.7.2 Huella peptídica o PMF (Peptide Mass Fingerprinting).....  | 124        |

## **CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE POTENCIALES INHIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASAS DE PAPA. CLONADO, EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD.....127**

|  |     |
|--|-----|
| 2.1 Secuenciación del extremo N-terminal de un inhibidor de carboxipeptidasa A.....  | 129 |
| 2.2 Expresión recombinante de StcCl.....   | 133 |
| 2.2.1 Purificación de StcCl.....   | 134 |
| 2.3 Ensayos de actividad inhibitoria de StcCl.....                                   | 136 |
| 2.3 Expresión de una variante del StcCl: 5N-StcCl.....                               | 138 |
| 2.3.1 Purificación de 5N-StcCl.....  | 141 |
| 2.4 Ensayos de actividad inhibitoria de 5N-StcCl.....                                | 143 |
| 2.5 Estudio del plegado oxidativo de StcCl y 5N-StcCl.....                           | 145 |
| 2.6 Modelado de StcCl y su interacción con CPA.....                                  | 150 |
| 2.6.1 Modelado en base a la estructura 2HLG.....                                     | 150 |
| 2.6.2 Superposición del modelo obtenido para StcCl sobre la estructura bCPA-PCI..... | 151 |
| 2.6.3 Modelado en base a la estructura 4CPA (PCI).....                               | 153 |
| 2.6.4 Análisis de interacción mediante <i>Molecular Docking</i> .....                | 153 |
| 2.6.5 Resumen y conclusiones del modelado de StcCl y su interacción con CPA.....     | 154 |

## **CAPÍTULO 3: CLONADO Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE UN NUEVO INHIBIDOR DE PROTEASAS OBTENIDO DE PAPAS ANDINAS.....15**

7

|  |     |
|--|-----|
| 3.1 Clonado de un inhibidor de CPA.....        | 159 |
| 3.2 Expresión heteróloga del PCI Chu.....      | 162 |
| 3.2.1 Purificación de PCI Chu.....             | 163 |
| 3.3 Cinética de inhibición.....                | 165 |
| 3.4 Cromatografía de afinidad CPA agarosa..... | 167 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.5 Análisis de huella peptídica o PMF (Peptide Mass Fingerprinting) y<br>secuenciación de novo PMF-MALDI-TOF-TOF/MS/MS..... | 170        |
| <b>Discusión.....</b>  | <b>177</b> |
| <b>Conclusiones Finales.....</b>   | <b>185</b> |
| <b>Referencias.....</b>  | <b>191</b> |





# Abreviaturas

---



## Abreviaturas

**ACI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Ascaris*  
**ADNc:** Ácido Desoxiribonucleico complementario  
**AGRP:** Péptido de señalización Relacionado con el péptido Agouti  
**ARN:** Ácido Ribonucleico  
**ASIP:** Péptido de Señalización Agouti  
**BBI:** Inhibidor de Tripsina de tipo Bowman-Birk  
**BBIC:** Inhibidor Concentrado Bowman-Birk  
**bCPA:** Carboxipeptidasa A bovina  
**BIR:** Repetición de Baculovirus IAP  
**BI-VI,** Inhibidor Bromeláneo VI de Ananá  
**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool  
**BPTI:** Inhibidor de Tripsina de Páncreas Bovino  
**cIAP1:** Inhibidor Celular de Proteína Apoptotica 1  
**CMTI I:** Inhibidor de Tripsina de *Curcubita máxima* 1  
**CPAh:** Carboxipeptidasa A Humana  
**CrmA:** Citoquina de respuesta modificada A  
**DTT:** Ditioneitol  
**EC:** Extracto crudo  
**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético  
**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico  
**EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**GEMSA:** Ácido 2-guanidinoetilmercaptosuccínico  
**GSH:** Glutación reducido  
**GSSG:** Glutación oxidado  
**HITCI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de Garrapata *Haemaphysalis longicornis*  
**HPLC:** High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)  
**IA<sub>3</sub>:** Inhibidor de Proteasas Aspárticas de levaduras  
**IAP:** Inhibidor de Apoptosis  
**IAPs:** Inhibidores de proteínas de la apoptosis  
**imaPCI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de papa *Solanum tuberosum* grupo andigenum cv. Imilla morada  
**IPs:** Inhibidores de Proteasas  
**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tioalactopiranósido  
**Ki:** Constante de inhibición

**LCI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela

**m/z:** Relación masa/carga

**MALDI-TOF MS** (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) (Espectrometría de Masas Laser de Desorción/Ionización Asistida por Matriz- Analizador de Tiempo de Vuelo)

**MCP:** Metalocarboxipeptidasa

**MCPs:** Metalocarboxipeptidasas

**MD:** Dinámica Molecular

**Medio LB:** Medio Luria-Bertani

**MGTA:** 2-mercaptometil-3-guanidinoetilpropanoico

**MMPs:** Metaloproteasas de Matriz

**MS/MS:** Espectrometría de Masas en Tándem

**NC-IUBMB:** (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)

**NGF:** Factor de Crecimiento Nervioso

**NvCI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Nerita versicolor*

**OMTKY3:** Tercer dominio Ovomucoide Turco

**PA:** Proteasas Aspárticas

**PC:** Proteasas Cisteínicas

**PCI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

**PDB:** Protein Data Bank (Base de datos de proteínas)

**PDGF:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

**PI-3,** Inhibidor de Pepsina 3 de *Ascaris suum*

**PI-9:** Inhibidor de Proteasas 9

**PMF:** Peptide Mass Fingerprinting (Huella Peptídica)

**PS:** Proteasas Serínicas

**PSA:** Persulfato de Amonio

**PVDF:** Floruro de Polivinilideno

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**RP-HPLC:** HPLC de Fase Reversa

**RT-PCR:** Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa)

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis Desnaturalizante en Geles de Poliacrilamida)

**SIDA:** Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida

**SMPI:** Inhibidor Proteico de Metaloproteasas de *Streptomyces*

**SSR:** Secuencias Simples Repetidas

**TAFI:** Inhibidor Trombina-Activable de la Fibrinólisis  
**TAP:** Péptido Anticoagulante de Garrapata  
**TCA:** Ácido Tricloroacético  
**TCI:** Inhibidor de Carboxipeptidasa de Garrapata  
**TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina  
**TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante beta  
**TIMP:** Inhibidor de Metaloproteasas de Tejido  
**t-PA:** Activador tisular de Plasminógeno  
**TRP:** Receptor Catiónico de Potencial Transitorio  
**TRPV1:** Receptor Catiónico de Potencial Transitorio V1  
**XIAP:** Inhibidor X-adosado a IAP



# Prólogo

---





## Prólogo

*La importancia del uso de herramientas proteómicas para elucidar estructuras proteicas, verificar presencia o ausencia de proteínas, o identificar proteínas en una muestra biológica ha proporcionado una ventaja adicional a las técnicas de caracterización de proteínas tradicionales.*

*Esta ventaja se acrecienta sobre todo en el caso de proteínas de bajo peso molecular, con las cuales la poderosa espectrometría de masas MALDI-TOF juega un rol importante.*

*La resolución isotópica que muestra dicha tecnología en proteínas y péptidos de bajo peso molecular, permite identificar y analizar proteínas con diferencias de pesos moleculares de entre 10 y 100 Da, e incluso podría discernir, dependiendo de la pureza y calidad de la muestra, casos de diferencias entre 1 y 5 Da de peso molecular entre cada proteína.*

*Esta importante herramienta ha provocado profundos avances en el estudio de proteínas pequeñas, suprimiendo a la electroforesis y otras técnicas capilares de alta resolución, incluso, según el caso, puede brindar mayor información que un “western blot” o que una identificación por ELISA.*

*Los inhibidores de proteasas en general son moléculas de bajo peso molecular, pertenecientes algunos de ellos (inhibidores de metalocarboxipeptidasas de papa) a un grupo de moléculas denominadas “cystine knot”, que conforman un grupo de miniproteínas estabilizadas por numerosos puentes disulfuro en relación a la cantidad de aminoácidos que componen la proteína, brindando a la molécula, entre otras características, una notable estabilidad frente al pH, la fuerza iónica, la temperatura.*

*Las miniproteínas tipo “cystine knot” pueden ser analizadas mediante herramientas proteómicas, constituyendo una ventaja para su estudio respecto del uso de otras técnicas.*

*La ventaja de un seguimiento cotidiano de la muestra y de una respuesta rápida en la obtención de resultados mediante el uso del MALDI-TOF MS, acelera los tiempos experimentales así como complementa y refuerza la eficiencia de esta técnica cuando se acopla e interacciona con: a) la búsqueda bibliográfica, b) otras técnicas analíticas resolutivas (HPLC, secuenciadores de proteínas) y los análisis brindados por la simulación bioinformática.*

*Disponer de un laboratorio de proteómica cuando uno estudia miniproteínas, es esencial y crucial para la continuidad del estudio y de la investigación.*

*Agradezco la enorme ayuda y colaboración que me brindó el Laboratorio de Proteómica y Bioingeniería de proteínas del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad Autónoma de Barcelona en aceptar mi incorporación mediante una estancia científica a trabajar en su Laboratorio bajo la dirección de la Dra. Julia Lorenzo y del Dr. Xavier Avilés.*

*Agradecemos a la Facultad de Ciencias Exactas y a la Universidad Nacional de La Plata por permitir dicha estancia.*



# Introducción

---



## **INTRODUCCIÓN**

### **I.1 Productos naturales en biomedicina**

El estudio de productos naturales permite obtener valiosa información acerca del funcionamiento de la naturaleza, la cual puede ser empleada para el diseño de tratamientos terapéuticos destinados para diferentes patologías.

Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes de compuestos usados como materia prima para el desarrollo de medicamentos, debido a su diversidad química y a que se les supone una toxicidad inicial limitada al encontrarse en seres vivos. La tecnología y la creación de instrumentos para una fina purificación es lo que permite detectar los componentes individuales que contienen las propiedades curativas (García-Fernández R. 2009). La tendencia notable desde los últimos 30 años, es el aumento en la aprobación de fármacos de base biológica, como anticuerpos monoclonales y vacunas, en comparación con moléculas pequeñas de origen sintético. Un estudio bioinformático muestra que los fármacos de origen natural poseen una mayor diversidad estructural que los sintéticos, además de una menor hidrofobicidad (Stratton C. F. 2015).

Entre esos productos se encuentran las proteasas y los inhibidores de proteasas (IPs) presentes en gran cantidad en familias de plantas autóctonas, algunas consideradas medicinales. Las fuentes vegetales de inhibidores de proteasas han sido escasamente exploradas y tienen la ventaja de su extraordinaria riqueza y diversidad. Por otro lado, en muchos casos, no existen patentes que dificulten su explotación, lo cual hace que sea un área viable para ser estudiada. Sumado a lo anterior, los avances recientes en Genómica y Proteómica han abierto nuevas perspectivas a la ciencia; en particular, el descubrimiento de proteasas como nuevas dianas terapéuticas, lo que ha convertido a sus inhibidores en moléculas con potencial actividad biomédica en el tratamiento de numerosas enfermedades (Jedinak 2005). Los IPs tradicionalmente estudiados se han desarrollado a partir de screening en fuentes naturales ya que los procedimientos de obtención por esta vía son en

general menos costosos y relativamente sencillos, en comparación con los procedimientos de obtención de inhibidores por la vía de la síntesis química.

La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima.

Estas sustancias inhibitorias se distribuyen en un amplio espectro de biomoléculas, las cuales desarrollan diversas actividades funcionales que forman parte de los mecanismos de defensa del vegetal frente a los depredadores. Por tanto, estas fuentes naturales prometen grandes esperanzas en la obtención de moléculas bioactivas novedosas y efectivas.

## **I.2 Proteasas**

Las proteasas (también denominadas proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas) catalizan la degradación de proteínas mediante la hidrólisis de uniones peptídicas. Dependiendo de la localización del sitio de clivaje, las proteasas pueden ser clasificadas como endoproteasas o exoproteasas. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la secuencia de una proteína, mientras que las exoproteasas degradan las uniones peptídicas desde el extremo N-terminal o el C-terminal de una proteína, y son denominadas aminopeptidasas y carboxipeptidasas, respectivamente.

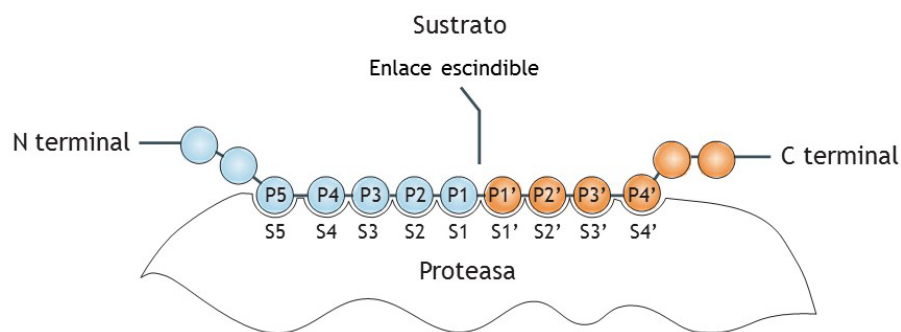
Las proteasas son moléculas esenciales, ya que desempeñan una gran variedad de acciones biológicas en organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos, e incluso en virus (Rawlings 2014). Actúan en procesos alimentarios, en la regulación de la fibrinólisis/coagulación, remodelado de tejidos, apoptosis y proliferación celular, mecanismos de defensa, fertilización y en la progresión del ciclo celular (Abbenante 2005).

La totalidad de las proteasas que se encuentran en un organismo ha sido definida como Degradoma (Puente 2003). El descubrimiento del completo repertorio de proteasas perteneciente a un microorganismo ha permitido el estudio de la implicación de la proteólisis en distintos estados fisiológicos y patológicos, obteniendo así, información acerca del rol biológico de las proteasas *in vivo* (Quesada V. 2009).

La actividad de estas proteasas debe ser cuidadosamente controlada, ya que su desregulación podría alterar la homeostasis de los organismos. Enfermedad cardiovascular e inflamatoria, cáncer, osteoporosis, desórdenes neurológicos, así como también enfermedades infecciosas como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Ébola, Malaria y enfermedad del sueño son algunas de las patologías desencadenadas por una disfunción de proteasas (Sajid and McKerrow 2002, Turk 2006). El control en la actividad de las proteasas puede realizarse mediante la regulación de la expresión o secreción de las peptidasas, la activación de propeptidasas y/o mediante la específica degradación de las enzimas maduras. Otro tipo de regulación ocurre a través del bloqueo de la actividad enzimática por parte de inhibidores específicos de proteasas. Esta forma adicional de control proteolítico se ha puesto en evidencia gracias a la acumulación de inhibidores en algunas células o tejidos de algunos organismos.

### **I.2.1 Especificidad de sustrato de las proteasas y su terminología**

El modelo más aceptado para la especificidad de sustrato de las proteasas es el de Schetcher y Berger (Berger 1967), quienes han propuesto un modelo conceptual para su descripción. En este modelo se considera que cada subsitio del sitio activo de la proteasa (S) es capaz de acomodar las cadenas laterales de un único residuo aminoacídico de sustrato (P). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el N-terminal como P1, P2, P3, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P1', P2', P3', etc. Los subsitios de la proteasa se numeran como S1, S2, S3 y S1', S2', S3' respectivamente (Figura I.1). El esquema presentado está obtenido de Turk & Guncar, 2003.



**Figura I.1.** Interacción enzima-sustrato. Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitos del sitio activo de una peptidasa.

## I.2.2 Clasificación de las proteasas

A través de la evolución, las proteasas se han adaptado a un largo rango de condiciones encontradas en organismos complejos (variaciones de pH, medio ambiente reductor, etc.) usando diferentes mecanismos catalíticos para la hidrólisis de sustratos. Esta diferencia en los mecanismos catalíticos que usan las proteasas ha sido aprovechada para desarrollar un sistema de clasificación basado en el tipo de reacción catalizada y en la localización del sitio de clivaje. Esta clasificación mediante el sistema de numeración EC (*Enzyme Commission number*) recomendada por el NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) clasifica a las enzimas basándose en las reacciones que las mismas catalizan. Siguiendo este sistema, las enzimas se encuentran divididas en seis clases: (1) Oxido-reductasas, (2) Transferasas, (3) Hidrolasas, (4) Liasas, (5) Isomerasas y (6) Ligasas. Las proteasas son enzimas que hidrolizan uniones peptídicas, por eso se encuentran clasificadas en la subclase 3.4 de acuerdo con la clasificación EC. Algunas proteasas clivan específicamente el sustrato en su extremo N- o C-terminal (ambos tipos conocidas como exopeptidasas) y/o en el interior de la cadena polipeptídica (endopeptidasas). Entre las exopeptidasas existen aquellas que actúan sobre el extremo N-terminal y eliminan un solo aminoácido (aminopeptidasas), dipéptidos (dipeptidil-peptidasas) o tripéptidos (tripeptidil-peptidasas). Aquellas exopeptidasas que actúan en el C-terminal pueden liberar un solo aminoácido o un dipéptido, y se denominan



carboxipeptidasas o peptidil-dipeptidasas respectivamente. Otras exopeptidasas catalizan la hidrólisis en residuos con modificaciones post-traduccionales en el N- o C-terminal (Por ejemplo, las omega peptidasas liberan residuos unidos mediante unión isopeptídica, es decir enlaces peptídicos distintos a aquellos que ocurren entre un grupo  $\alpha$ -carboxilo y  $\alpha$ -amino).

La clasificación completa de las proteasas puede encontrarse en el siguiente enlace: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>. Las sub-familias de proteasas más relevantes se pueden observar en la Tabla I.1.

**Tabla I.1 Clasificación de las proteasas de acuerdo con el NC-IUBMB**

| Número EC | Tipo de proteasa                   |
|-----------|------------------------------------|
| 3.4.11    | Aminopeptidasas                    |
| 3.4.13    | Dipeptidasas                       |
| 3.4.14    | Dipeptidil-peptidasas              |
| 3.4.15    | Peptidil-di peptidasas             |
| 3.4.16    | Carboxipeptidasas tipo serino      |
| 3.4.17    | Metalocarboxipeptidasas            |
| 3.4.18    | Carboxipeptidasas tipo cisteino    |
| 3.4.19    | Peptidasas Omega                   |
| 3.4.21    | Serin endopeptidasas               |
| 3.4.22    | Cistein endopeptidasas             |
| 3.4.23    | Endopeptidasas asparticas          |
| 3.4.24    | Metaloendopeptidasas               |
| 3.4.25    | Treonin endopeptidasas             |
| 3.4.99    | Endopeptidasas de tipo desconocido |

Otro sistema de clasificación es el que utiliza la base de datos MEROPS, la cual fue propuesta por Rawlings y Barret como un método sistemático para clasificar proteasas, basado en características estructurales y de secuencia. La clasificación jerárquica se realiza en un principio agrupando proteasas de secuencias homólogas en especies, las especies se agrupan en familias y las familias en clanes. Una familia contiene secuencias relacionadas, y un clan contiene estructuras relacionadas. El análisis de secuencia se encuentra restringido a la porción de proteína directamente responsable de la actividad proteolítica la cual es llamada “unidad peptidasa”. La unidad peptidasa incluye el sitio primario de interacción y los residuos catalíticos. Existen hasta el momento 244 familias y 55 clanes (Rawlings N. D. 2016).

A cada familia de proteasas, le corresponde una letra identificando el tipo de sitio catalítico de la proteasa (Aspártica (A), Cisteínica (C), Glutámica (G), Metallo (M), Asparagina (N), Mixtas (P), Serina (S), Treonina (T) y Desconocida (U)) más un número. Algunas familias se encuentran divididas en sub familias porque hay evidencia de una divergencia muy antigua dentro de la familia y se representan con la adición de una letra (ej. la familia M14 de metalocarboxipeptidasas está dividida en cuatro subfamilias M14A, M14B, M14C y M14D). La lista completa de las familias y clanes de proteasas puede ser encontrada en la base de datos MEROPS en internet <http://merops.sanger.ac.uk/>.

### **I.2.3 Metalocarboxipeptidasas**

Las carboxipeptidasas pueden ser definidas como enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas en el extremo C-terminal de péptidos y proteínas.

La acción de carboxipeptidasas puede ocurrir mediante tres mecanismos catalíticos diferentes: haciendo uso de un residuo de serina en el sitio catalítico, una cisteína o un átomo de zinc. Este último grupo representa a las metalocarboxipeptidasas (MCPs) las cuales poseen un átomo de  $Zn^{+2}$  fuertemente unido en su estructura que se encuentra directamente implicado en la catálisis enzimática (Hooper NM. 1996).

Estas enzimas llevan a cabo una amplia gama de funciones fisiológicas, que van desde la digestión de alimentos hasta el control fino de la señalización celular.

Basándose en sus motivos de interacción y relaciones estructurales, esta clase de enzimas se encuentra nucleada en la familia M14 de la base de datos MEROPS. Como hemos nombrado, dentro de la misma existen cuatro subfamilias: M14A, M14B, M14C y M14D (Rawlings N. D. 2016).

Dentro de cada subfamilia, el grado de identidad de secuencia es del 25-63%, pero disminuye solo al 15-25% cuando las dos familias son comparadas (Arolas 2007).

Además, las MCPs pueden ser clasificadas de acuerdo a la especificidad de sustrato en: MCPs con preferencia por aminoácidos hidrofóbicos en el C-terminal (tipo-A), MCPs con preferencia por aminoácidos básicos en el C-terminal (tipo-B), por aminoácidos ácidos en el C-terminal (tipo-O) y MCPs con amplia especificidad de sustrato (Lyons P.J. & Fricker L.D. 2011). Las enzimas tipo-A pueden ser a su vez divididas en tipo-A1 (preferencia por residuos alifáticos pequeños y grandes residuos aromáticos) o tipo-A2 (preferencia marcada por residuos aromáticos grandes). (Gardell 1988, Tanco S. 2013).

Las carboxipeptidasas pancreáticas A1, A2 y B típicamente funcionan solo como enzimas digestivas, mientras que el resto de MCPs incluyendo la carboxipeptidasa A de mastocitos (CPA3) y la carboxipeptidasa U, ejercen su acción en procesos selectivos, principalmente en procesos no digestivos, y aún llamadas erróneamente carboxipeptidasas (pancreáticas).

### **I.3 Inhibidores de proteasas**

Como hemos expresado anteriormente, uno de los mayores mecanismos de regulación de la actividad proteolítica de los seres vivos es el uso endógeno y exógeno de inhibidores de proteasas (Turk 2006). La mayoría de los inhibidores de proteasas de la naturaleza son proteicos, con la excepción de pequeños inhibidores de microorganismos (Bode W. 1992). Sorprendentemente el número de inhibidores descritos en organismos vivos

es muy bajo en comparación con el número de peptidasas conocidas hasta el momento.

Los inhibidores de proteasas de naturaleza proteica son polipéptidos que inhiben la acción de proteasas y se encuentran extensamente distribuidos en diferentes tejidos de animales, plantas y microorganismos (Laskowski M Jr 1980).

### **I.3.1 Clasificación de los inhibidores de proteasa**

Los inhibidores de proteasas pueden ser clasificados de diferentes formas. En la base de datos MEROPS, existe una clasificación de inhibidores de proteasas que se caracteriza por tener la misma agrupación de clanes y familias que tienen las proteasas.

Un clan de inhibidores de peptidasas contiene todos los inhibidores de hoy en día que han surgido a partir de un único origen evolutivo. Es un grupo de inhibidores de una o más familias que muestran evidencia de su relación evolutiva por su similitud en sus estructuras terciarias. Cada clan de inhibidores tiene un identificador de dos letras, en el que la primera letra es "I". Algunas familias aún no se pueden asignar a un clan, y cuando se requiere una asignación formal, tal familia se describe como perteneciente al clan I-. Existen en la actualidad 79 familias de inhibidores (Rawlings N. D. 2016).

Los inhibidores pueden ser clasificados por su mecanismo de inhibición, por ej. los inhibidores pueden interactuar con el sitio activo de las proteasas de las siguientes maneras: a) como lo hace el sustrato, b) a través de un sitio externo, adyacente al sitio activo para cubrirlo de forma externa; c) a través de las formas anteriores al mismo tiempo, o d) interactuando en una zona de interdominio lejos del sitio activo de la proteasa previniendo su dimerización en caso de inhibidores alostéricos (Bode W. 2000, Otlewski J. 2005). Los inhibidores de proteasas también pueden ser clasificados en base al sitio catalítico de las proteasas que inhiben (Tabla I.2).

**Tabla I.2.** Características estructurales y mecánicas de inhibidores de proteasas peptídicos. Tabla tomada de (Otlewski J. 2005).

| Tipo de proteasa  | Inhibidor                | Ejemplos   | Características de inhibición   | Tamaño del inhibidor                      |
|-------------------|--------------------------|--|---|---|
| <b>Serino</b>     | Inhibidores canónicos    | BPTI, OMTKY3, eglin c, CMTI I  | A menudo se comportan cómo inhibidores fuertes y rápidos, de interacción no covalente que se asemeja al complejo Michaelis, bloqueo directo del sitio activo, no producen cambios conformacionales y suelen formar hojas $\beta$ antiparalelas entre el inhibidor y la enzima.                                      | 3-21 kDa por dominio                      |
|                   | Inhibidores no canónicos | Hirudin, TAP, ornitodorin  | Interacción extremadamente fuerte, rápida y específica en dos etapas cinéticas. Inhibición a través de la interacción del N-terminal en el sitio activo.  | 6-8 kDa por dominio                       |
|                   | Serpin                   | $\alpha$ -1-antitripsina, antitrombina                                 | Complejo covalente e irreversible acil-enzima, mecanismo de trampa de ratón, grandes cambios conformacionales, inhibidor suicida y disrupción del sitio activo de la proteasa.  | 45-55 kDa                                 |
| <b>Cisteínica</b> | Cistatinas               | Cistatina de pollo, cistatina C, stefin B, quininógeno                 | Extremadamente fuertes pero no específicos, inhibición reversible y no covalente, interacción a través de la cuña formada por dos <i>hairpin loops</i> y a través del N-terminal. Cys25 accesible en el complejo e interacción importante a través de la posición P2.   | 11-13 kDa, hasta 60-120 kDa (quininógeno) |
|                   | Tiropinas                | p41, equistatina   | Inhibición muy fuerte, mecanismo similar a las cistatinas pero a menudo más específico. Inusual inhibición de proteasas cisteínicas y aspárticas a través de diferentes dominios de equistatin.   | 7 kDa por dominio                         |
|                   | Inhibidores bromelicos   | BI-VI  | Inhibición moderadamente fuerte a bajo pH y no inhibición a pH neutro, semejanza estructural a ihibidores canónicos de tipo Bowman-Birk.  | 6-8 kDa                                   |
|                   | Stafostatinas            | Stafostatin B  | Inhibición moderadamente fuerte, mecanismo de inhibición similar a inhibidores canónicos, estructura diferente de cistatinas, inusual conformación de Gly en P1, orientación del inhibidor similar al sustrato, gran área de interacción, importancia de la posición P1'  | 11 kDa                                    |
|                   | IAP                      | XIAP, cIAP1  | Inhibición altamente específica, cinética de unión fuerte y reversible, también inhibición a través de un interdominio flexible.  | 9 kDa por dominio BIR                     |
|                   |                          | CrmA, PI-9   | Inhibición altamente específica, mecanismo de inactivación similar a las serpinas.  | 38 kDa                                    |
|                   |                          | P35  | Inhibición no específica, acil-enzima irreversible, distorsión del sitio activo, el N-terminal de p35 esconde la Cys360 catalítica de moléculas de agua, considerables cambios conformacionales en el inhibidor.  | 35 kDa                                    |
| <b>Metallo</b>    |                          | PCI, LCI   | Fuerte complejo enzima-producto, inhibición a través del segmento C-terminal, importante rol de Val38 (P1), no se producen cambios conformacionales en el inhibidor.  | 4 kDa                                     |
|                   |                          | SMPI   | Inhibidor moderadamente específico, mecanismo de inhibición similar a inhibidores canónicos de serin-proteasas, inhibición temporal.  | 11 kDa                                    |
|                   |                          | Inhibidor de <i>P. aeruginosa</i> , Inhibidor de <i>E. chrisantemi</i> | Han sido observadas fuertes y débiles inhibiciones, gran interacción de cinco residuos del N-terminal, el grupo amino del N-terminal forma una unión de coordinación con el Zn, en analogía con TIMPs   | 15 kDa                                    |
|                   |                          | TIMP1-4  | Interacción no covalente, fuerte pero no altamente específica, contacto a través del N-terminal en el sitio activo, coordinación catalítica del Zn a través del N-terminal, la mayor interacción es a través del residuo P1', cambios conformacionales moderados en el inhibidor durante la formación del complejo. | 20-22 kDa                                 |
| <b>Aspártica</b>  |                          | IA <sub>3</sub>  | Inhibición fuerte y altamente específica, totalmente desplegado en estado libre, forma una larga hélice en el complejo no covalente.  | 8 kDa                                     |
|                   |                          | PI <sub>3</sub>  | Inhibición fuerte pero no muy específica, una hoja <i>b</i> entre la enzima y el inhibidor, no se producen cambios conformacionales.  | 17 kDa                                    |

BPTI: Inhibidor de Tripsina de Páncreas Bovino; OMTKY3: Tercer dominio Ovomucoide Turco; CMTI I: Inhibidor de Tripsina de *Curcubita máxima* 1; TAP: Péptido Anticoagulante de Garrapata; BI-VI, Inhibidor Bromeláneo VI de Ananá; IAP: Inhibidor de Apoptosis; XIAP: Inhibidor X-adosado a IAP; cIAP1: Inhibidor celular de Proteína Apoptótica 1; BIR: Repetición de Baculovirus IAP; CrmA: Citoquina de respuesta modificada A; PI-9: Inhibidor de Proteasas 9; PCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa;

LCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela; SMPI: Inhibidor Proteico de Metaloproteasas de *Streptomyces*; TIMP: Inhibidor de Metaloproteasas de Tejido; IA<sub>3</sub>: Inhibidor de Proteasas Aspárticas de Levaduras; PI-3, Inhibidor de Pepsina 3 de *Ascaris suum*.

Aunque han sido identificados inhibidores frente a serín, cisteín, aspártico o metaloproteasas, no ha ocurrido lo mismo con inhibidores frente a treonín o glutámico proteasas. Los inhibidores de serínproteasas ocupan la clase de mayor extensión de inhibidores, la cual se encuentra dividida en más de 20 familias. Entre ellos se encuentran los inhibidores canónicos pertenecientes a las familias Kazal (Kazal fue la primer persona que descubrió el inhibidor de tripsina secretado por el páncreas, de ahí su nombre), Kunitz/BPTI, e hirudina, así como también los no-canónicos de la familia serpin (del inglés *serine protease inhibitors*). Los miembros de los últimos, se encuentran ampliamente distribuidos dentro y fuera de las células, y presentan diversos roles incluyendo la regulación de la coagulación de la sangre, activación del complemento, fibrinólisis, inflamación e inhibición de la apoptosis (Silverman 2001, Krowarsch 2003, Rau 2007). El siguiente grupo más grande de inhibidores es el de las cisteín proteasas. Como ocurre con los inhibidores de serín proteasas, se encuentran divididos en varias familias que incluyen, las cistatinas, tiropinas, kininógenos, e inhibidores de proteínas de la apoptosis (IAPs) (Rzychon *et. al.*, 2004). El interés del estudio de inhibidores de cisteín proteasas se ha incrementado por la implicación de cisteín proteasas en muchos procesos fisiológicos importantes. Por ejemplo, las cistatinas inhiben las catepsinas lisosomales que quizás puedan escapar de los lisosomas, y la familia de IAPs son inhibidores de caspasas que bloquean la fase de ejecución de la apoptosis (Dubin, 2005). Por el contrario, solo unos pocos inhibidores de aspártico y metaloproteasas han sido reportados hasta el momento: dos inhibidores de proteasas aspárticas (pepsina y equistatina), unos pocos inhibidores bacterianos de las familias metzincin y gluzincin de MPs, varios inhibidores de metaloproteasas de tejido (TIMPs), y no más de diez inhibidores de MCPs.

### I.3.2 Inhibidores de metalocarboxipeptidasas

Las MCPs son inhibidas por varios agentes quelantes como la 1,10-fenantrolina. Además, el ácido bencil succínico inhibe específicamente MCPs de tipo-A, y compuestos como el ácido 2-guanidinoetilmercaptosuccínico (GEMSA) y el ácido 2-mercaptometil-3-guanidinoetiltiopropánico (MGTA) inhiben enzimas de tipo-B, con una constante de inhibición ( $K_i$ ) del orden de entre micro y nanomolar (Vendrell 1999). A diferencia de las endoproteasas, las metalocarboxipeptidasas solo poseen unos pocos inhibidores peptídicos identificados y caracterizados en diferentes fuentes naturales: en la familia *Solanaceae*, en tomate (MCPI) y papa (PCI) (Rees and Lipscomb 1982, Arolas 2007); en *Solanum tuberosum* grupo andigenum cv. Imilla morada (imaPCI) (Lufrano D. 2015); en el parásito intestinal *Ascaris suum* (ACI) (Sanglas 2009); en la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis* (LCI) (Reverter 2000); en las garrapatas *Rhipicephalus bursa* (TCI) (Arolas 2005) y *Haemaphysalis longicornis* (HITCI) (Gong 2007); *Nerita versicolor* (NvCI) (Covaleda 2012); en tejidos de rata y humanos (latexina o ECI) (Normant 1995, Pallares 2005); y en el anélido marino *Sabellastarte magnifica* (SmCI) (Alonso-del-Rivero 2009).

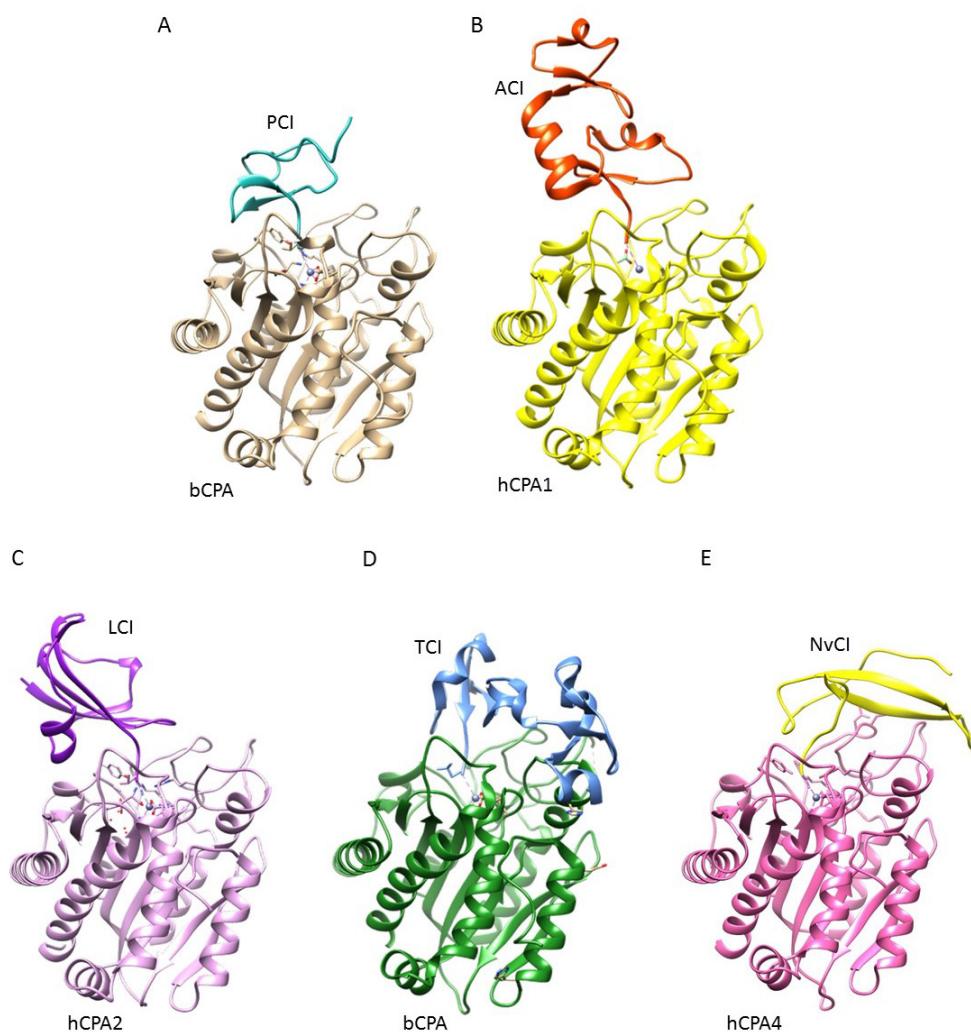
### I.3.3 Mecanismo de inhibición de las metalocarboxipeptidasas

Los inhibidores de MCP hasta ahora descriptos pueden ser divididos en dos grupos según su mecanismo de inhibición: los que actúan imitando el sustrato interaccionando con el sitio activo, y los que realizan un bloqueo estérico del mismo. En el primero se pueden describir los mecanismos de inhibición del PCI (Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa), ACI (Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Ascaris*), LCI (Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela), TCI (Inhibidor de Carboxipeptidasa de de garrapata) y del NvCI (Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Nerita versicolor*) de, los cuales se basan en la interacción de su extremo C-terminal con la cavidad del sitio activo imitando la interacción del sustrato (Vendrell 2000). Como se ha observado en la estructura cristalográfica de estos inhibidores en complejos junto a la carboxipeptidasa A bovina, y a las carboxipeptidasas A1, A2 y A4 humanas

(Rees and Lipscomb 1982, Reverter 2000), la cadena C-terminal de los inhibidores se encuentra insertada en el sitio activo de la enzima formando el primer sitio de interacción particularmente los residuos C-terminales Gly39 en el PCI y Glu66 en el LCI son removidos pero se mantienen unidos en el subsitio S1' de la carboxipeptidasa, ocultos por el resto del inhibidor. El nuevo residuo C-terminal (Val38 o Val65) se encuentra coordinado con el  $Zn^{2+}$  del sitio activo y mediante un puente de hidrógeno al oxígeno del fenol de la Tyr248 de la enzima. Algunos átomos de la cadena lateral de la Val38 se encuentran a una distancia de Van der Waals del oxígeno del grupo carbonilo de la Ser197 y Tyr198 y de las cadenas laterales de Ile247, Tyr248, Tyr198 y Phe279. En el complejo LCI, Val65 también forma un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato de Glu270 y otro puente de hidrógeno con el grupo guanidinio de Arg127. Por otro lado, el grupo carbonilo del oxígeno de las Tyr37/64 se encuentra unido mediante puente de hidrógeno al grupo guanidinio de la Arg71 de la enzima. Algunas interacciones secundarias son los residuos 15, 22 y 27-30 del PCI, y los residuos de los loops  $\beta 1-\beta 2$ ,  $\beta 3-\alpha 1$  y  $\alpha 1$  del LCI, y mayormente los residuos 246-248 de las enzimas, las cuales son de importancia ya que refuerzan la interacción enzima-inhibidor.

En las estructuras de la Figura I.2 se puede observar como los sitios S1, S2 y S3 de la carboxipeptidasa están envueltos en los contactos con el inhibidor. Las numerosas interacciones con los residuos esenciales para la interacción del sustrato y la catálisis probablemente suman para que la inhibición sea eficiente. Adicionalmente, hay un excelente ajuste o acople entre las superficies de la región globular de los inhibidores y las carboxipeptidasas, lo cual excluye cualquier penetración y promueve la formación de un fuerte complejo.



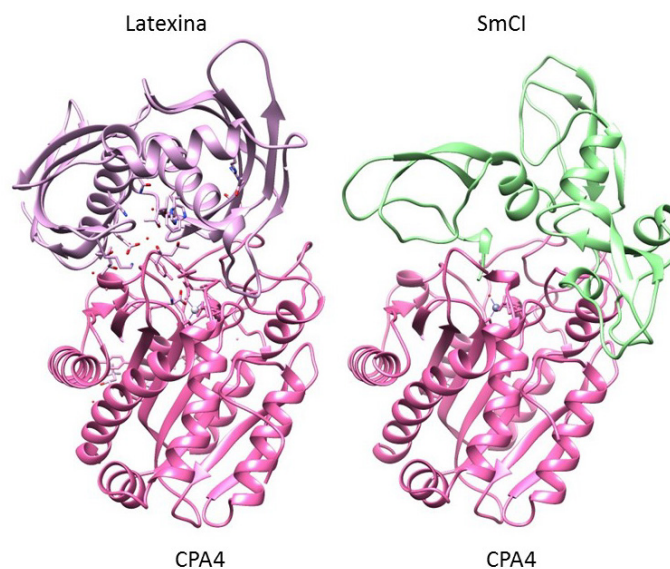


**Figura 1.2:** Estructuras cristalográficas de los complejos carboxipeptidasa-inhibidor. A, CPA bovina-PCI; B, hCPA1 (CPA1 humana)-ACI; C hCPA2-LCI; D CPA bovina-TCI y E hCPA4-NvCI.

Las estructuras del PCI y del LCI en los complejos son completamente diferentes, exceptuando el extremo C-terminal, donde las estructuras se observan de forma idéntica en ambas proteínas. Dado que las secuencias de los residuos de la región C-terminal es la única región conservada podría ser un claro ejemplo de evolución convergente dictada por las metalocarboxipeptidasas target (Reverter D 1998).

Por otro lado, la estructura cristalográfica del SmCI (Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Sabellastarte magnifica*) en complejo con CPA4 muestra una zona de interacción a través del N-terminal con el sitio activo, pero además

se encuentra bloqueando la carboxipeptidasa de forma estérica. La gran diferencia es que este inhibidor posee un tamaño mayor que los inhibidores que interaccionan con las MCPs a través del C-terminal, es una proteína de 19,7 kDa y posee 3 dominios, de los cuales D1 y D2 son necesarios para la inhibición de CPA. La latexina también se describe como este tipo de inhibidores, es una molécula más grande aún de 25 kDa, pero a su vez ninguno de sus extremos se encuentra implicado en la inhibición de las CPAs. La inhibición se produce a través de la interacción de la latexina por la parte superior del embudo que forma la estructura de la CPA (Figura I.3).



**Figura I.3:** Estructuras cristalográficas de los complejos carboxipeptidasa-inhibidor, CPA4 humana-Latexina y CPA4 humana-SmCI.

#### I.3.4 Inhibidores de proteasas en plantas.

Los inhibidores de proteasas fabricados por las plantas son pequeñas proteínas que contribuyen a la defensa contra insectos. Al bloquear la acción de proteasas intestinales, frenan el crecimiento del mismo y provocan su muerte por ayuno. Estos inhibidores se encuentran principalmente en los granos y tejidos de reserva de las plantas alcanzando concentraciones notables (5-15% de la proteína total). También se han detectado, en menor proporción, inhibidores de proteasas en tejidos susceptibles (brotes y hojas) al

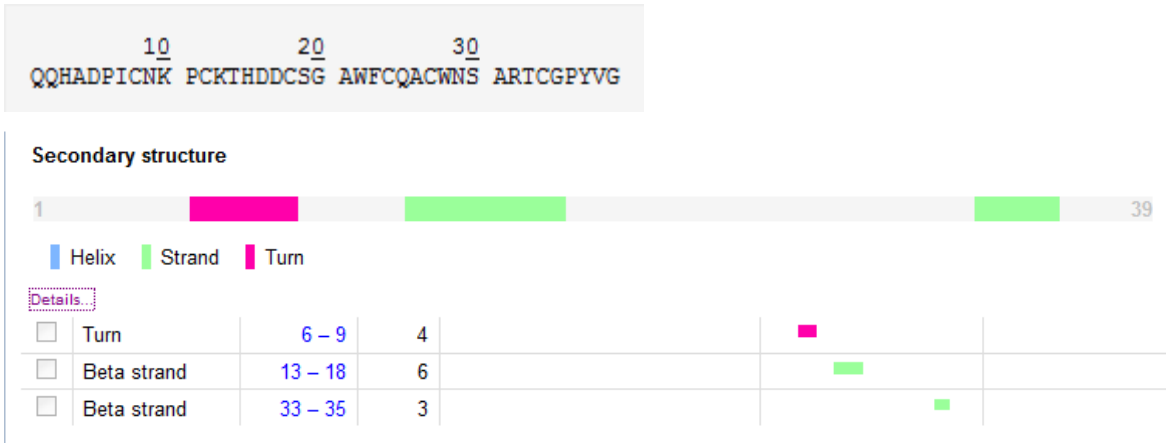
ataque de insectos y microorganismos patógenos (Ryan 1990, Brzin 1995, Hartl M 2011).

En respuesta a las señales desencadenadas durante la producción de una herida, los inhibidores de proteasas no sólo se sintetizan localmente, sino también a distancia. Las señales que inducen esta síntesis incluyen algunos oligosacáridos, señales eléctricas, ácido abscísico y sistemina, un pequeño péptido de 18 aminoácidos. La acumulación sistémica de inhibidores de proteasas en las partes no heridas decae con la edad y no se observa en plantas maduras. Por ello, se ha sugerido que la función de estos péptidos en los sistemas de defensa podría estar restringida a una ventana de desarrollo bastante estrecha. Sin embargo, la respuesta local persiste a lo largo de la vida de la planta. Algunos insectos recurren a estrategias diversas para eludir la defensa vegetal: incrementan su actividad proteolítica, inducen enzimas proteolíticas insensibles a los inhibidores de proteasas o expresan proteasas que degradan específicamente a los inhibidores producidos por las plantas y para las cuales no tiene inhibidores. Además, algunas poblaciones de insectos varían genéticamente en su tolerancia a los inhibidores de proteasas. De hecho, los insectos pueden desarrollar con suma celeridad tolerancia a los inhibidores de proteasas, incluso cuando se exponen a especies vegetales distintas a las de su hábitat natural (Jorge M. Vivanco 2005).

Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos, destacándose entre éstas, proteasas serínicas (PS), cisteínicas (PC), aspárticas (PA) y metalocarboxipeptidasas (MCP). Los inhibidores contra PS, PC y MCP son ubicuos, es decir, que pueden ser encontrados en varios órganos de la planta, pero los inhibidores de PA no han sido hasta ahora detectados en semillas, aún, cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar.

El inhibidor de plantas más estudiado hasta el momento es el inhibidor de carboxipeptidasa de papa (PCI, siglas en inglés, Potato Carboxipeptidase Inhibitor), que fue el primero que se caracterizó por el trabajo pionero de Hass, Neurath, Ryan y colaboradores (G.M. Hass 1976, Neurath 1976, Ryan 1980).

El PCI, una proteína globular de 39 residuos, es una de las más pequeñas que se ha descrito. Las estructuras primaria (secuencia lineal) y secundaria son mostradas en la Figura I.4.

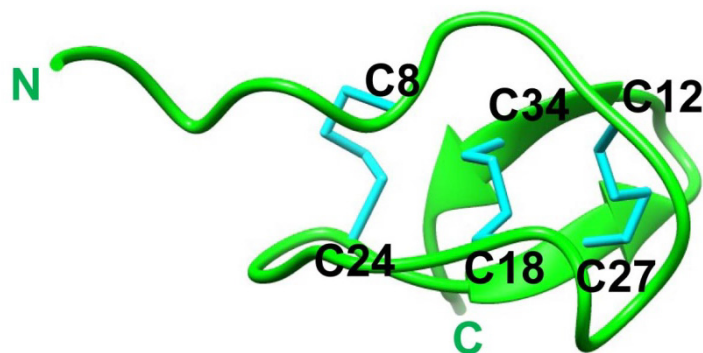


**Figura I.4:** Estructuras primaria y secundaria del PCI estudiado (P01075 (MCPI\_SOLTU) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot).

La estructura 3-D se conoce en solución acuosa (G.M. Clore 1987), y como un complejo cristalizado con carboxipeptidasa A (Rees and Lipscomb 1982). Por otro lado, la estructura en solución y el esqueleto dinámico del inhibidor de carboxipeptidasa de papa recombinante también fue caracterizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear “RMN” (Gonzalez 2003).

El núcleo globular de 27 residuos del PCI se encuentra estabilizado por tres puentes disulfuro y carece de estructura secundaria regular (Figura I.5). El PCI pertenece a la super familia de proteínas llamadas “cystine-not” o “knot”, llamadas así por su particular patrón de puentes disulfuros (S.L. Lin 1995).

El papel funcional del extremo N-terminal se encuentra atribuido no a la inhibición en sí, sino al correcto plegado de la molécula para adquirir su forma nativa (Venhudova 2001).



**Figura I.5:** Modelo del PCI donde puede observarse la distribución de los puentes disulfuro en color cian y las cisteínas que lo componen, además de los extremos N-terminal (N) y C-terminal (C).

El PCI es expresado como una pro-proteína y la misma se acumula en las vacuolas. La incapacidad de la pro-forma de inhibir carboxipeptidasas, y su estabilidad a la digestión de carboxipeptidasas, sugieren que el dominio C-terminal puede tener, además de una función vacuolar, como ya se sugirió para la isoforma del tomate (Martineau B 1991), un papel en la modulación de la actividad inhibitoria del PCI (es decir el proinhibidor, no inhibe la enzima y es estable a su digestión). El C-terminal del PCI se acopla penetrando en el sitio activo de la carboxipeptidasa, dando lugar a un mecanismo de inhibición tipo tapón. El inhibidor se comporta como un producto peptídico estrechamente ligado. Su residuo C-terminal (Gly39) es escindido por la enzima y el resto del inhibidor se mantiene ligado a la enzima por varios contactos.

La importancia funcional de la cola (residuos 35-39) es debido a que es el sitio de contacto primario de la enzima. De hecho, todos los residuos en la cola C-terminal establecen contactos con CPA, excepto Gly35 (Rees and Lipscomb 1982).

Por otra parte, un corto tramo de residuos del núcleo central, es conocido como el sitio secundario de unión (residuos 28-31). Ambos sitios de interacción han sido experimentalmente demostrados por estudios de modificación química (G.M. Hass 1976), por lo que dichas regiones se consideran esenciales para la interacción.

El pequeño tamaño del PCI y el elevado número de restricciones conformacionales que contiene (tres puentes disulfuros en 27 residuos)

constituyen un serio desafío para un rediseño. La mutagénesis en el núcleo fácilmente perturba los enlaces disulfuro y la conformación nativa de la proteína. De hecho, el PCI es un buen modelo para estudiar los problemas relacionados con la ingeniería de pequeñas proteínas ricas en puentes disulfuro. Su pequeño tamaño y la rigidez interna facilitan la simulación computacional de rediseño de proteínas por aproximaciones de dinámica molecular (MD) (Zhang H 2012).

Entre las características encontradas para esta molécula, un hallazgo interesante es que el PCI se comporta como un antagonista del EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), y se trata del primer antagonista del EGF humano que ha sido registrado, por lo tanto, podría tratarse de un agente antitumoral putativo (Blanco-Aparicio C 1998). Se sabe que el EGF y su receptor (EGFR) están involucrados en muchos aspectos del desarrollo de carcinomas, como el crecimiento de células tumorales, la vascularización, la invasión y metástasis. Como el EGFR se ha encontrado sobreexpresado en muchos tumores de origen epitelial, es un objetivo potencial para la terapia antitumoral. Se ha demostrado que el PCI compite con EGF para unirse al EGFR e inhibe la activación del EGFR y la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento. El PCI suprime el crecimiento de varias líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano, tanto *in vitro* como en ratones desnudos. Aunque varios inhibidores de proteasas han sido señalados como posibles agentes antitumorales (Trow 1993), este es el primer caso en que el efecto no es el resultado de su actividad inhibidora de proteasa, sino que su comportamiento es como un antagonista del EGF.

### **I.3.5 Aplicaciones potenciales de los inhibidores de proteasas**

Las aplicaciones de los inhibidores de proteasas han estado dirigidas fundamentalmente al área de la salud humana, que constituye hasta ahora su “blanco” principal. Existen varios ejemplos de IPs de origen vegetal que se han testado en distintos ensayos biológicos, entre ellos el PCI como anticoagulante. Cuando el Inhibidor Trombina-Activable de la Fibrinólisis (TAFI) es activado, disminuye la lisis de los coágulos de sangre mediante el clivaje de

residuos Lisina y Arginina del C-terminal de fibrina parcialmente degradada. Sin embargo, Nagashima y colaboradores han demostrado que la coadministración sistémica de PCI junto al Activador tisular de Plasminógeno (t-PA) mejora la lisis del mismo (Nagashima M 2000).

Se puede mencionar a las cistatinas de plantas (fitocistatinas) que inhiben proteasas cisteínicas, entre ellas las caspasas, enzimas involucradas en el proceso de apoptosis y por ende en el desarrollo de enfermedades degenerativas y autoinmunes (Thornberry 1998).

Se han aislado también inhibidores de metaloproteasas (Hass 1979, Hass 1981); los cuales son de mucha importancia ya que la regulación de las metaloproteasas de matriz (MMPs) es fundamental en el tratamiento de enfermedades tales como la artritis, el cáncer y la aterosclerosis (Nagase. 1996).

Respecto a inhibidores de otro tipo catalítico, se ha obtenido, a partir de semillas, un gran número de inhibidores de proteasas serínicas. Entre ellos cabe mencionar un inhibidor extraído de semillas de *Leucaena leucocephala* que inhibe plasmina y exhibe propiedades anticoagulantes *in vivo* (Oliva 2000) y el Inhibidor de Tripsina de Tipo Bowman-Birk (BBI) presente en soja que ha demostrado actividad anticancerígena en ensayos clínicos y en ensayos *in vitro* (Kennedy 2002, Chen 2005). Un extracto de soja enriquecido en BBI, llamado Bowman-Birk inhibidor concentrado (BBIC), está en estudio en la FDA (Food and Drug Administration) el cual podría administrarse para aumentar o mantener los niveles de moléculas controladoras de proteasas en el cuerpo, especialmente en el tracto digestivo (Losso 2008).

Por otro lado, se han desarrollado plantas transgénicas que expresan inhibidores de proteasas con la finalidad de adquirir mayor resistencia a plagas y así lograr mayor rendimiento en los cultivos. Se han realizado ensayos en plantas de tabaco para conseguir resistencia a larvas de *Manduca sexta* (gusano cachón del tabaco) expresando el inhibidor de proteinasa II. Se observó que las larvas alimentadas con hojas de plantas transgénicas que expresaban el inhibidor de proteinasa II crecían más lentamente que las alimentadas con hojas del control. Esto indica que la inhibición del crecimiento de las larvas de *M. sexta* alimentadas con las hojas de plantas transgénicas se

debe principalmente a la inhibición de tripsina causada por el inhibidor II (Ramírez 2003).

También podemos citar la inserción de los genes para la expresión de inhibidores de serínproteasas en cultivos de algodón lo cual mejora la resistencia al ataque de larvas de lepidópteros (Dunse KM 2010). El estudio en conjunto de proteasas digestivas de este tipo de plagas, es esencial para el desarrollo de métodos de control que actúen a través del tubo digestivo (Terra 2005), de esta manera, conociendo las proteasas involucradas en el proceso, pueden expresarse los inhibidores específicos para el control de insectos fitófagos.

Finalmente podemos citar algunos estudios de las últimas décadas en epilepsia, los cuales indican que metaloproteinasas y serínproteasas como tripsina serían factores claves en el desarrollo de la enfermedad, que al encontrarse en el medio extracelular, resultarían ser una buena diana terapéutica para futuras intervenciones farmacológicas (Lukasiuk K 2011). Además, se han realizado estudios acerca del tratamiento de enfisemas en ratones con un inhibidor de proteasas proveniente de *Rhipicephalus Boophilus microplus*. Los efectos positivos encontrados en el tratamiento de enfisema con dicho inhibidor podría deberse a la inhibición de la neutrófilo elastasa y a una consecuente pérdida de activación de la metaloproteasa 12 (MMP-12) (Lourenço J D 2014).

Y por último, han sido descubiertos inhibidores de proteasas en el aparato reproductor de peces los cuales son descritos como protectores de infecciones microbianas (Dietrich MA 2016), así mismo podrían ser aplicados a diferentes infecciones que afectan a los humanos.

#### **I.4 Miniproteínas de tipo *knot***

Las miniproteínas de tipo knot constituyen una clase de biomoléculas que combinan características de proteínas y péptidos, teniendo un tamaño de péptidos pero una estructura característica de proteínas. Poseen generalmente alrededor de treinta aminoácidos y están definidas mediante una estructura terciaria extraordinariamente estable. En general constituidas mediante tres



hojas  $\beta$  antiparalelas, conectadas mediante loops de un largo y composición de secuencia variables, y unidas entre ellas mediante un característico patrón de tres puentes disulfuro llamado nudo (*knot*) de cisteínas. En este patrón, uno de los puentes disulfuro pasa a través del anillo formado por los otros dos puentes estableciendo la estructura característica. Este es el motivo por el cual el nombre "*knottting*" fue asignado a estas moléculas con estos particulares puentes disulfuro (Chiche L 2004). La distribución de estos enlaces otorga a las miniproteínas knot una extraordinaria estabilidad proteolítica, térmica y química. Pueden ser hervidas, incubadas a 65°C por semanas, o incluso incluidas en HCl o NaOH 1N, sin perder su integridad funcional ni estructural (Werle M 2007, Kimura RH 2009, Wang CK 2009, Heitz A 2008). Muchas de estas miniproteínas son de por sí resistentes frente a las proteasas presentes en el suero o incluso frente a proteasas intestinales con lo cual podrían administrarse oralmente como fármacos. Miembros de la familia de factores de crecimiento, como factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento nervioso (NGF), o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también contienen un cuerpo del tipo knot de tres puentes disulfuro. Sin embargo, los loops que sobresalen del core o centro knot son más largos que lo normal para este tipo de miniproteínas, más flexibles y por lo tanto no muestran las características de estabilidad que presentan las proteínas knot (Kolmar 2009).

Los representantes de las familias de proteínas con cisteínas de tipo knot, tales como los inhibidores de proteasas de plantas; péptidos de las familias de plantas *Rubiaceae* y *Violaceae*; toxinas de caracoles como marinos, arañas, insectos, cangrejo herradura o escorpión; péptidos de tipo Gurmarin; proteínas relacionadas con el dominio C-terminal de la proteína Agouti humana; y por último péptidos antimicrobianos se encuentran nucleados en la base de datos KNOTTIN (Gelly JC 2004) (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>).

#### I.4.1 Miniproteínas naturales

Las proteínas de tipo knot han sido aisladas de varias fuentes naturales, como artrópodos, moluscos, esponjas, vertebrados, hongos y plantas. El único motivo conservado que poseen es la distribución de los loops flanqueados por cisteínas y el modo en que forman los puentes disulfuro. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos entre estas proteínas son muy variables lo que incluye un amplio espectro de actividades biológicas.

Han sido aisladas proteínas knot de caracoles marinos con *target* en canales iónicos operados por voltaje. El ejemplo más prometedor es la  $\omega$ -conotoxina MVIIa, un potente bloqueador de canales de calcio derivado del molusco *Conus magus*, que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con dolor crónico severo (Williams JA 2008). Otras conotoxinas se encuentran en fase clínica I/II para indicaciones similares. Además, esta clase de miniproteínas se encuentran bajo consideración para el tratamiento de lesiones cerebrales por accidente cerebro vascular isquémico, ya que existe evidencia de que el bloqueo de canales de calcio podría ser de valor terapéutico para este asunto (Perez-Pinzon MA 1997, Massote PD 2008).

El PCI aislado de papa es una proteína que con sus tres puentes disulfuro y su tamaño responde a las características de tipo knot. Esta molécula ha sido presentada como antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Blanco-Aparicio C 1998) e incluso ha sido estudiado el mecanismo por el cual ejerce su efecto (Sitjà-Arnau M 2005).

Muchas proteínas aisladas del veneno de arañas, como  $\omega$ -agatoxinas, robustoxina, versutoxina, y proteína 5 (Pallaghy PK 1994) actúan como inhibidores de canales iónicos. En el veneno de la tarántula Trinidad chevron *Psalmopoeus cambridgei* se ha reportado que existen proteínas knot que tienen como target el receptor de capsaicina TRPV1 (Receptor catiónico de potencial transitorio V1), un canal de excitación expresado en neuronas sensitivas de la vía del miedo, y funciona como agonista de TRP (Receptor catiónico de potencial transitorio). Estas vanillotoxinas activan los canales de excitación en neuronas somatosensoriales para provocar el pánico y la inflamación en mamíferos (Siemens J 2006). Otra dos proteínas knot,

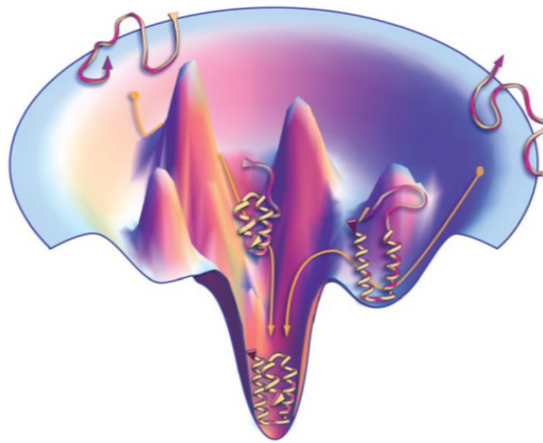
psalmopeotoxinas I y II fueron aisladas del veneno de la misma tarántula y ha sido presentado como un inhibidor del estado intraeritrocítico del parásito *Plasmodium falciparum* de la malaria (Choi SJ 2004, Pimentel C 2006).

Miniproteínas cisteínicas de tipo knot de origen humano son el Péptido de Señalización Agouti (ASIP) y el Péptido de Señalización relacionado con el Péptido Agouti (AGRP), que contienen dominios C-terminales con un plegado de tipo knot. Ellos actúan como agonistas inversos que controlan, respectivamente, la pigmentación y la función metabólica. AGRP es un antagonista endógeno de los receptores de melanocortina-3 y melanocortina-4 acoplados a proteína G. El dominio C-terminal de AGRP (AGRP 87-132) posee cuatro puentes disulfuro y una estructura bien definida de tipo knot que muestra plena actividad comparando con el total de la proteína (Jackson PJ 2002, Wilczynski AM 2005, Yu B 2007).

## **1.5 El plegamiento de proteínas y la formación de puentes disulfuro**

Las proteínas son sintetizadas como una cadena polipéptidica la cual es rápidamente plegada en una única estructura tridimensional. El correcto plegamiento es necesario para la función biológica de las proteínas, por eso su entendimiento es uno de los desafíos de la ciencia desde la mitad del último siglo. Aunque el mecanismo se encuentra actualmente muy descripto mediante el avance de técnicas físicas y químicas así como también, computacionales, quedan cuestiones por resolver. Para destacar la importancia del entendimiento del plegamiento proteico, podemos referirnos a enfermedades tales como el Alzheimer, la fibrosis quística y la enfermedad de Parkinson, las cuales se encuentran asociadas a un fallo en el correcto plegado proteico (Uversky V. N. 2000 , Dobson 2001, Luk K C 2012).

Como es sabido hasta el momento, las proteínas no siguen un estricto mecanismo para plegarse, sino más bien una búsqueda aleatoria de todas las posibles conformaciones accesibles a una específica cadena polipeptídica. El paisaje energético (*energy landscape*) del plegado de una proteína es representado por un embudo rugoso (*rough funnel*) con un gradiente de energía libre que se dirige hacia la estructura nativa (Figura 1.6)

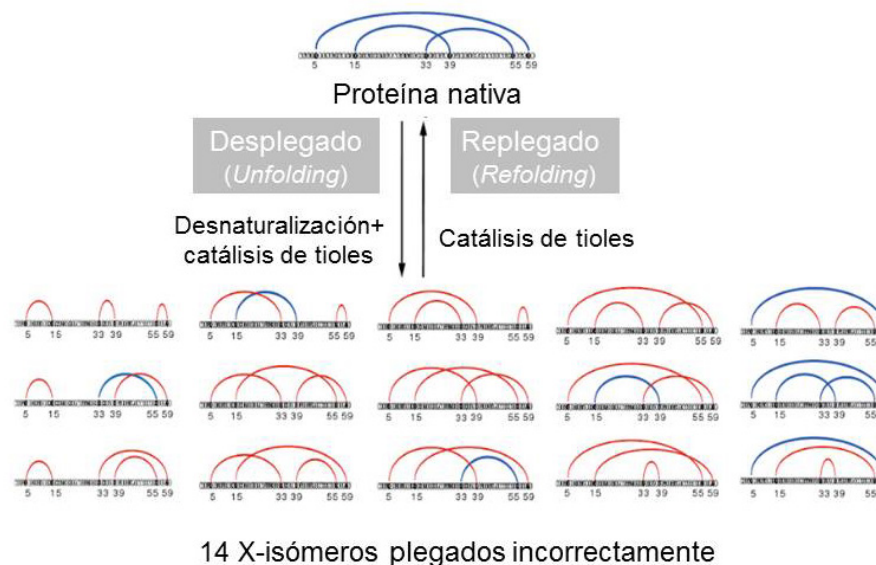


**Figura 1.6:** Paisaje energético (*energy landscape*) con varias zonas elevadas, donde se observan estructuras de una proteína desplegadas, solo pocos puntos de baja energía con estructuras en distintos estados de plegamiento y en la zona más baja del embudo se puede observar la estructura plegada o nativa. Como se puede apreciar, el plegado ocurre mediante trayectorias alternativas. Tomado de (Dill KA 2012).

De esta manera diferentes caminos de plegamiento son posibles a lo largo del embudo con una energía mínima local que da lugar a los intermediarios de plegamiento. Estos intermediarios están generalmente en el camino hacia la conformación nativa, pero también pueden existir algunos que no, actuando como trampas de plegamiento (*folding traps*) (Dobson 2003).

### 1.5.1 Plegado oxidativo

El estudio del plegamiento proteico se hace dificultoso ya que involucra la identificación y caracterización de los intermediarios que solamente se encuentran presentes en un corto lapso de tiempo así como lo es también la determinación de la particular formación de puentes disulfuro de una proteína.



**Figura I.7:** Formación de los X-isómeros producidos entre el desplegado y el replegado reversible de una proteína nativa (*scrambling*). Aquí se presenta una proteína con tres puentes disulfuro y la formación de los 14 posibles X-isómeros plegados incorrectamente. Adaptado del capítulo 5 del libro *Folding and Disulfide Proteins* (Chang 2011).

Una de las técnicas usadas para realizar este tipo de estudio es el plegado oxidativo (*oxidative folding*). Esta técnica tiene la ventaja de permitir la captura de los intermediarios mediante alquilación (irreversible) o acidificación (reversible) de la reacción de plegamiento. En el plegado oxidativo, las proteínas son inicialmente reducidas y desnaturalizadas totalmente y luego se impulsa el replegado en presencia de buffers seleccionados conteniendo diferentes agentes redox. Durante el proceso de plegamiento, los intermediarios son capturados en distintos tiempos de reacción, separados mediante cromatografía líquida de fase reversa de alto rendimiento (RP-HPLC), y luego la siguiente caracterización en términos de conexión de puentes disulfuro y estructura tridimensional (Arolas 2006).

## I.6 Importancia de la inmovilización de enzimas

En los últimos años, la biotecnología y sus aplicaciones industriales han experimentado grandes avances en la obtención de productos bioquímicos, farmacéuticos y alimenticios. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas

frente a los catalizadores convencionales no biológicos: constan de una gran actividad catalítica; muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad); son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

### **I.6.1 Inmovilización de proteasas para captura de inhibidores peptídicos**

Una de las técnicas que más frutos ha dado para la obtención de inhibidores peptídicos a partir de muestras biológicas complejas es la inmovilización de enzimas en soportes específicos. Entre ellas podemos citar al polímero modificado denominado glioxil-agarosa. Este compuesto presenta una serie de interesantes características desde el punto de vista práctico, las cuales son aprovechadas para la confección de rellenos utilizados para el desarrollo de cromatografías de afinidad.

Usando estos soportes, se puede aumentar la rigidez de las moléculas enzimáticas y por lo tanto hacerlas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros, comparados con las moléculas solubles. Además, el grueso de la estructura proteica no se verá afectada aun cuando se hayan establecido un gran número de enlaces (Guisan 2006). La agarosa corresponde a un tipo de soporte utilizado para inmovilizar enzimas debido a sus buenas propiedades físico-químicas: a mayor grado de entrecruzamiento, se tiene mayor superficie, y dado que las fibras que componen la agarosa son más gruesas y el tamaño del poro se hace más pequeño, este soporte se puede cargar con más grupos reactivos. Este tipo de soporte, debido a sus características físico-químicas, ha sido utilizado para inmovilizar mediante la técnica de unión multipuntual covalente, algunas enzimas tales como: penicilina G acilasa de *Escherichia coli* (Alvaro 1990)

tripsina (Soler 1997),  $\alpha$ -quimotripsina de páncreas bovino (Guisan 1991) y otras proteasas (Yust 2007). El método de inmovilización multipuntual covalente, es aquel en el que los residuos aminoacídicos de la molécula enzimática reaccionan con los residuos de un soporte activado, quedando ubicada la enzima en su superficie mediante el establecimiento de varios puntos de unión. El entrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre alteración alguna en su estructura. De todas formas, el entrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo 1998, Montes 2006).

## **I.7 Importancia de la proteómica para el estudio de enzimas e inhibidores**

El estudio de las interacciones proteicas entre sí y con sus ligandos, es fundamental y de gran interés para comprender las funciones celulares, así como para la aplicación eficiente de la mayoría de las estrategias biomédicas y biotecnológicas basadas en ellas. La espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica analítica adecuada para el rastreo de ligandos debido a su alta resolución y sensibilidad, rápido análisis y fácil automatización; y que además, puede facilitar el uso de protocolos a gran escala o high-throughput. Se ha establecido un método denominado 'Intensity Fading MALDI-TOF MS', herramienta de la interactómica, adecuado para investigar interacciones no-covalentes entre proteasas e inhibidores (Yanes 2007).

La combinación de la inmovilización de proteasas junto a la espectrometría de masas MALDI-TOF permite el rastreo de ligandos (IPs) de forma rápida y precisa, posibilitando su posterior caracterización mediante técnicas convencionales.

## Perspectivas de estudio

La información brindada en esta parte introductoria nos posibilita disponer de un conocimiento de funciones, estructuras, distribución y acción de los inhibidores de proteasas y de las miniproteínas denominadas “cystine knot”. El estudio se centra en el aprovechamiento de diversas técnicas de última generación para un mejor conocimiento de estas moléculas.

En el desarrollo del plan de trabajo de esta tesis, se tuvieron en cuenta las siguientes pautas y conceptos importantes:

- La regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, por esto la actividad de muchas proteasas se encuentra bajo estudio intensivo, ya que los inhibidores de proteasas (IP) son un tipo de regulador de las mismas.
- El empleo de productos vegetales para la cura de enfermedades tales como el cáncer, el SIDA y la malaria, entre otras, puede ser una de las claves terapéuticas a utilizarse en el futuro.
- La tecnología y la creación de instrumentos para una fina purificación es lo que nos permitirá detectar los componentes individuales que contienen las propiedades curativas, soportes de la industria farmacéutica y de la biomedicina.

Con todo esto y aprovechando la disponibilidad de infraestructura y la experiencia adquirida por nuestro grupo de trabajo, se propuso aislar, caracterizar, clonar y expresar nuevas miniproteínas inhibidoras de proteasas (carboxipeptidasas) “*cystine knot*” de origen vegetal a partir de tubérculos de papas andinas variedad churqueña.



# Objetivos

---



## OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es: aislar, identificar, caracterizar, clonar y expresar en forma recombinante nuevas miniproteínas inhibidoras de proteasas (carboxipeptidasas) de tipo “*cystine knot*” de origen vegetal a partir de extractos de tubérculos de papas andinas variedad Churqueña.

Los objetivos específicos propuestos para el desarrollo de este trabajo, son los siguientes:

- Obtener extractos crudos a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad “Churqueña”, que sean aptos para verificar presencia de actividad inhibitoria de proteasas.
- Evaluar la actividad inhibitoria del extracto vegetal obtenido frente a proteasas de diferentes tipos mecanísticos
- Caracterizar bioquímicamente el extracto crudo mediante electroforesis, isoelectroenfoque, contenido proteico, estabilidad térmica, entre otros ensayos.
- Diseñar matrices de afinidad para inmovilizar proteasas diana (carboxipeptidasa A/B, tripsina, papaína) selectivas en soportes de glioxil-agarosa.
- Inmovilizar en forma covalente y recuperable carboxipeptidasa A/B, tripsina y papaína.
- Purificar preliminarmente los IPs mediante cromatografía de afinidad empleando CPA/B inmovilizada en glioxil agarosa.
- Purificar a homogeneidad los inhibidores empleando intercambiadores iónicos, fase reversa, etc.
- Caracterizar bioquímicamente los inhibidores aislados mediante electroforesis, isoelectroenfoque, PMF, etc.
- Caracterizar los inhibidores obtenidos por técnicas proteómicas (masa molecular, huella peptídica, intensity fading, entre otras).
- Clonar y expresar miniproteínas “cystine knot” inhibidores de CPs.

- Estudiar el plegamiento de las miniproteínas “cystine knot” mediante plegamiento oxidativo.
- Analizar el potencial inhibitorio de los IPs o miniproteínas expresadas.
- Obtener modelos estructurales de los inhibidores o miniproteínas estudiadas mediante técnicas bioinformáticas y caracterizar su interacción con las proteasas.

# **Materiales & Métodos**

---



## **MATERIALES & METODOS**

### **M.1 Material vegetal**

*Solanum tuberosum* es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia (ya que pierde sus hojas y tallos aéreos en la estación fría), de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m. de altura (Milan 1987). Las hojas son compuestas, con 7 a 9 folíolos, de forma lanceolada y se disponen en forma espiralada en los tallos. Presentan tres tipos de tallos; uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos (Faiguenbaum 1988). El tubérculo es uno de los tallos subterráneos de la papa y se halla engrosado como una adaptación para funcionar como órgano de almacenamiento de nutrientes. Los rizomas presentan una zona meristemática sub-apical, de donde se originan los tubérculos mediante un engrosamiento radial, producto del alargamiento de las células parenquimáticas y la pérdida de la polaridad de las mismas. Durante la formación del tubérculo, el crecimiento longitudinal del estolón se detiene y las células parenquimáticas de la corteza, de la médula y de regiones perimedulares sufren divisiones y alargamiento. En tubérculos maduros, existen pocos elementos conductores y no hay un cámbium vascular continuo. Los tubérculos están cubiertos por una exodermis, que aparece al romperse la epidermis, que va engrosándose con el tiempo. Sobre su superficie existen "ojos", hundimientos para resguardar las yemas vegetativas que originan los tallos, que están dispuestos de forma helicoidal. Además, hay orificios que permiten la respiración, llamados lenticelas. Las lenticelas son circulares y el número de las mismas varía por unidad de superficie, tamaño del tubérculo y condiciones ambientales. Los tubérculos, en definitiva, están constituidos externamente por la peridermis, las lenticelas, los nudos, las yemas y, eventualmente, por un fragmento o una cicatriz proveniente de la unión con el rizoma del cual se originaron; internamente se distingue la corteza, el parénquima vascular de reserva, el anillo vascular y el tejido medular. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada u oblonga; su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo (Faiguenbaum 1988).

En cuanto a la clasificación de las papas, la misma aún se encuentra en discusión y en muchos casos se continúa haciendo uso de clasificaciones antiguas como la de Hawkes (Hawkes 1990). Existen nuevas clasificaciones basadas en análisis genéticos como la consideración de la ploidía, las cuales muestran una reorganización taxonómica diferente a la planteada por Hawkes.

**Tabla M.1:** Clasificación taxonómica de papas cultivadas, por (Hawkes 1990), (Ochoa 1990, Ochoa 1999) y (Spooner D.M. 2007) tomada de (Ryoko 2015).

| Hawkes (1990)   | Ochoa (1990, 1999)  | Spooner et al. (2007)                                      |
|---|---|--|
| <i>Solanum ajahuiri</i>   | <i>S. xajahuiri</i>   | <i>S. ajanhuiri</i>  |
| <i>S. curtilobum</i>  | <i>S. xcurtilobum</i>   | <i>S. curtilobum</i>                                       |
| <i>S. juzpeczukii</i>   | <i>S. xjuzpeczukii</i>  | <i>S. juzpeczukii</i>                                      |
| <i>S. tuberosum</i><br>subesp. <i>andigena</i> Hawkes<br>subesp. <i>Tuberosum</i> | <i>S. tuberosum</i><br>subesp. <i>andigena</i> Hawkes<br>subesp. <i>Tuberosum</i> | <i>S. tuberosum</i><br>Grupo Andigenum<br>Grupo Chilotanum |
|   | <i>S. hygrothermicum</i>  |  |
| <i>S. chaucha</i>   | <i>S. xchaucha</i>  | <i>S. tuberosum</i> (Grupo Andigenum)                      |
| <i>S. phureja</i>   | <i>S. phureja</i>   | <i>S. tuberosum</i> (Grupo Andigenum)                      |
|   | <i>S. stenotomum</i>  |  |
| <i>S. stenotomum</i>  | <i>S. goniocalix</i>  | <i>S. tuberosum</i> (Grupo Andigenum)                      |

La clasificación más actual de (Spooner D.M. 2007); se encuentra basada en el análisis genético de 742 variedades con secuencias simples repetidas (SSR) y marcadores de cloroplastos, y sugiere una reclasificación de las papas cultivadas en las siguientes cuatro especies: i) *S. tuberosum*, con dos grupos de cultivares (Grupo Andigenum, que contiene genotipos diploides, triploides y tetraploides; y el Grupo Chilotanum de variedades chilenas de naturaleza tetraploide); ii) *S. ajanhuiri* (diploide); (iii) *S. juzpeczukii* (triploide); y (iv) *S. curtilobum* (pentaploide) (Ryoko 2015). Los cruzamientos producidos dentro del grupo andigenum han dado lugar a la gran variedad de papas de distintos colores que hoy conocemos.





**Figura M.1:** *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad Churqueña

## **M.2 Preparación de los extractos crudos**

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *S. tuberosum* subespecie andigenum variedad Churqueña (Figura M.1). Se pelaron alrededor de 60,5 g de los mismos, habiendo estado congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se prepararon distintos extractos crudos generados con distintos procedimientos de extracción, tal como se describe a continuación:

- En el primer procedimiento de extracción las papas fueron trituradas en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,2 con multiprocesadora manteniendo la temperatura baja. Se procedió incubando en heladera durante 40 min para permitir que el almidón sedimente. Se recibió el sobrenadante en tubos de muestra (50 ml.) y se centrifugó a 3000  $\times g$  durante 60 min. a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Nuevamente se centrifugó el sobrenadante, pero a una velocidad de 12000  $\times g$  por 60 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido se transvasó a tubos eppendorf y se centrifugó a 14500  $\times g$  por 60 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- En el segundo procedimiento, las papas se pusieron en contacto con ácido ascórbico a razón de 4 g por Kg de papa para prevenir la oxidación de polifenoles, en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,2 a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego se procedió a la sedimentación del almidón mediante incubación por 40 min en heladera, y a posteriori el sobrenadante fue centrifugado a 3000  $\times g$  por 60 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en tubos de muestra de 50 ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf y se procedió a

centrifugar a 14500  $\times g$  durante 60 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante en tubos eppendorf para su almacenamiento a -80°C.

- En el tercer protocolo de extracción, los tubérculos fueron triturados en 170 ml de agua fría, en presencia de ditioneitol (DTT) a una concentración de 1 mM para prevenir la oxidación de polifenoles, manteniendo baja la temperatura al sumergir el recipiente contenedor en hielo. Luego, se transvasó el homogenato obtenido a tubos de muestra y se incubó en la heladera durante 40 min, permitiendo que sedimente el almidón. Una vez descartado el sedimento, el sobrenadante fue filtrado con papel de filtro y centrifugado en tubos de muestra a 3000  $\times g$  por 60 min a una temperatura de 4°C. El nuevo sobrenadante se centrifugó a 14500  $\times g$  por 60 min a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -80°C.
- Se trituraron los tubérculos en 170 ml de agua destilada fría manteniendo baja la temperatura al sumergir el recipiente contenedor en hielo. Luego se transvasó el homogenato obtenido a tubos de muestra y se incubó en la heladera durante 40 min permitiendo que sedimente el almidón. El sobrenadante resultante se transvasó a tubos de muestra y se centrifugó a 3000  $\times g$  durante 60 min a una temperatura de 4°C. Nuevamente se centrifugó el sobrenadante, pero ahora a una velocidad de 12000  $\times g$  por 60 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se incorporó a tubos eppendorf y se centrifugó a 14500  $\times g$ . Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado a través de filtro de Orange Sci PES de 0,2  $\mu m$  con jeringa BD Plastipak de 1 ml; obteniéndose de este modo el extracto crudo (EC), el cual fue almacenado a -80°C.

### **M.3 Cuantificación proteica por el método de Bradford (Bradford 1976)**

El método se basa en la unión de Coomassie Blue G-250 a la proteína. Dicha unión produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm. (forma marrón del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el tradicional método de Lowry.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,2-1,4 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 25-200 µg/ml para el micrométodo:

Macrométodo:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Reactivo de Bradford | 2500 µl |
| Muestra              | 50 µl.  |

Micrométodo:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Reactivo de Bradford | 2000 µl |
| Muestra              | 150 µl. |

Se realizó el blanco correspondiente utilizando el reactivo de Bradford.

#### **M.4 Screening o búsqueda de actividades inhibitorias de proteasas de diferentes tipos mecanísticos**

A los EC se les realizaron determinaciones de actividad inhibitoria de proteasas empleando las siguientes proteasas blanco y sustratos cromogénicos específicos:

##### **M.4.1 Determinación de actividad inhibitoria de tripsina**

La actividad de la tripsina fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 300 s a 37°C.

Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1 M; CaCl<sub>2</sub> 50 mM; pH 7,2.

Solución de enzima: Tripsina de tipo I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich).

Concentración de enzima:  $2,8 \times 10^{-7}$  M

Solución de sustrato: BAPNA (N-alfa-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) 10 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Extracto crudo (inhibidor) | 200 µl |
| Solución de enzima         | 100 µl |
| Buffer de reacción         | 750 µl |
| Solución de sustrato       | 50 µl  |

#### **M.4.2 Determinación de actividad inhibitoria de papaína**

La actividad de la papaína fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 s a 37°C. La inhibición se manifestó por la no hidrólisis del sustrato específico sintético por parte de la papaína.

Buffer de reacción: buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,5; KCl 0,3 M; EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) 0,1 mM y DTT 3 mM.

Solución de enzima: Papaína de *Carica papaya* (Roche).

Concentración de enzima:  $4,5 \times 10^{-8}$  M

Solución de sustrato: L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA) 4 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Extracto crudo (inhibidor) | 200 µl |
| Solución de enzima         | 100 µl |
| Buffer de reacción         | 750 µl |
| Solución de sustrato       | 50 µl  |

#### **M.4.3 Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A**

La actividad de la bCPA (Carboxipeptidasa A bovina) fue registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm mediante medidas continuas durante

120 s a 37°C. La inhibición causó disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de hidrólisis.

Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,2 M; pH 7,5.

Solución de enzima: CPA de páncreas bovino (Sigma-Aldrich).

Concentración de enzima:  $7,0 \times 10^{-9}$  M

Solución de sustrato: N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH (AAFP) 10 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Extracto crudo (inhibidor) | 200 µl |
| Solución de enzima         | 100 µl |
| Buffer de reacción         | 750 µl |
| Solución de sustrato       | 50 µl  |

#### **M.4.4 Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina**

La actividad de la subtilisina fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 300 s a 37°C.

Buffer de reacción: Tris-HCl 50 mM de pH 8,6 con 10% de DMSO.

Solución de enzima: Subtilisina de *Bacillus Licheniformis* (Sigma-Aldrich).

Concentración de enzima:  $2,0 \times 10^{-7}$  M

Solución de sustrato: Benciloxycarbonil-glicil-glicil-L-leucina-4-nitroanilida (ZGGLNA).

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Extracto crudo (inhibidor) | 200 µl |
| Solución de enzima         | 100 µl |
| Buffer de reacción         | 750 µl |
| Solución de sustrato       | 50 µl  |

## M.5 Determinación de IC50: curva dosis-respuesta

La IC50 fue determinada midiendo la actividad inhibitoria de los extractos a distintas concentraciones proteicas, hasta que la actividad enzimática disminuyó completamente. En nuestro caso fueron desde 0 a 300 µg/ml, en total 15 concentraciones proteicas diferentes: 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/ml. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Con la finalidad de determinar el valor de IC50 se normalizaron las pendientes relativas a la pendiente obtenida sin extracto y expresadas en porcentaje. Luego se utilizó el programa GraphPad para ajustar los datos a la siguiente ecuación:

Ecuación 2:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(X - \log IC_{50})}}$$

Dónde X es el log de la concentración proteica ensayada e Y es la actividad de bCPA normalizada.

$$Y = \frac{v_i}{v_0} \times 100 = \frac{\left( \frac{\Delta Abs_{350nm}}{\Delta t (min)} \right)_{Potato\ ext}}{\left( \frac{\Delta Abs_{350nm}}{\Delta t (min)} \right)_{Control}} \times 100$$

El valor IC50 es la concentración de extracto necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la enzima (bCPA en este caso) (Copeland 2005).

## M.6 Tratamiento térmico del extracto crudo

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas (Bártová V. 2008). En base a esta premisa, las muestras fueron tratadas térmicamente por

calentamiento a 70°C, 85°C, y 100°C durante 60 minutos en baño de María. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14500  $\times g$  durante 90 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

### **M.7 Método para concentración de proteínas: liofilización**

La liofilización es un proceso que consiste en deshidratar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo gracias a condiciones de vacío. Es decir que, el hielo (sólido) pasa directamente a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene un producto seco, esponjoso, mejorando su estabilidad y fácilmente de ser re-disuelto en agua.

Se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15°C por debajo de su temperatura eutéctica (temperatura más baja a la cual es posible encontrar una fase líquida) para evitar la formación de cristales de H<sub>2</sub>O. Se coloca el producto en un contenedor o cámara hermética y se procede a realizar vacío en la misma hasta alcanzar una presión por debajo de la presión de vapor correspondiente al hielo a la temperatura de congelamiento. Manteniendo siempre el producto por debajo de la temperatura eutéctica, se produce la sublimación del hielo. Los vapores producidos en la sublimación son retenidos en un condensador que se encuentra a una temperatura inferior a la del producto congelado. Cuando todo el hielo es eliminado, se dice que el secado primario ha sido terminado. Finalizado el proceso el producto debe almacenarse en un contenedor hermético ya que por su estado es ávido de captar humedad ambiente.

Ventajas de la técnica de liofilización:

- La temperatura a la que es sometido el producto, se encuentra por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.

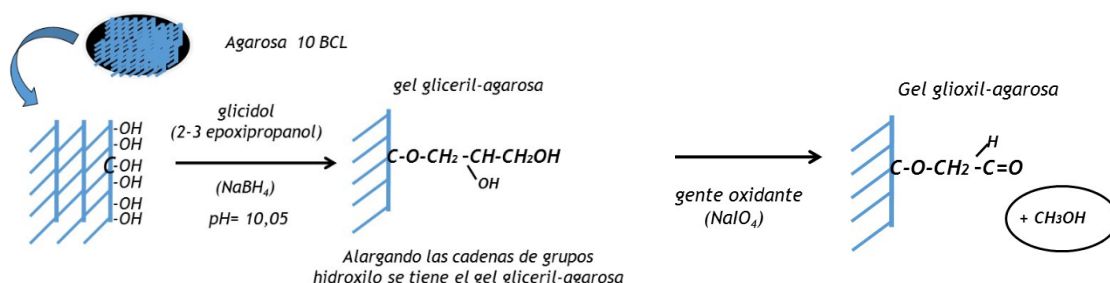
- Debido a la baja temperatura a la que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
- Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío.
- La gran porosidad del producto facilita la reconstitución con rapidez por la adición de agua o del solvente adecuado.
- Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por mucho tiempo (dependiendo de las características de cada producto), constituyendo productos de larga estabilidad.

## **M.8 Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa**

El soporte utilizado para la inmovilización de carboxipeptidasa A fue agarosa 10 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado con grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoacídicos de la enzima. Para ello, tal como se muestra en la Figura M.2, se utiliza un protocolo de activación con glicidol, el cual permite la interacción covalente con la agarosa en un extremo y la incorporación de un grupo aldehído en el otro extremo para la interacción mediante reacción de Schiff con la proteína a inmovilizar (Soler 1997, Guisan 2006). En resumen, se preparó una solución de agarosa de 180 ml (conteniendo 105 g. de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación una solución conteniendo 3,4 g de NaOH y 1,425 g de NaBH<sub>4</sub> y luego se agregaron gota a gota 36 ml de glicidol. Esta mezcla se dejó en agitación de paletas durante 18 h aproximadamente (en baño frío porque se trata de una reacción exotérmica). Luego se lavó el gel varias veces con abundante agua destilada, operación que se realizó filtrando bajo vacío (en un filtro con fritas para no dañar la agarosa). De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel: a 105 g de gel activado se le adicionaron 1410 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 5,136 g de NaIO<sub>4</sub> en 240 ml de agua



destilada ( $\text{NaIO}_4$  100 mM). Luego se dejó oxidar suavemente con agitación de paletas durante 2,5-3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel glioxil-agarosa con abundante agua destilada de igual forma a la descrita previamente.



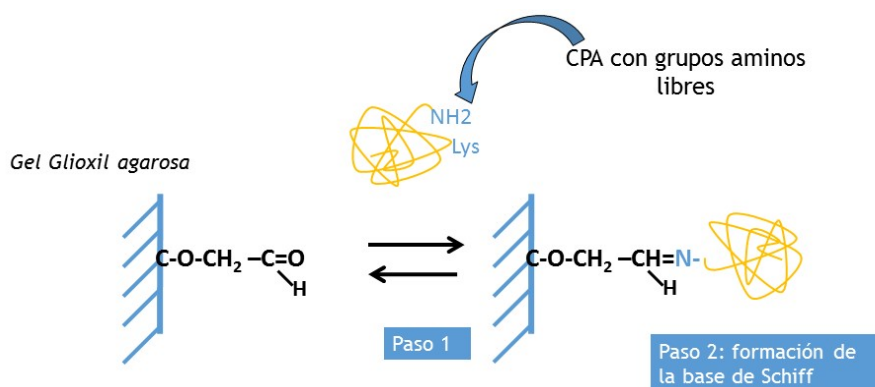
**Figura M.2:** Activación de la Agarosa 10 BCL con glicidol. Alargamiento de la cadena y generación de un grupo aldehído para reacción de Schiff.

La inmovilización se realizó a  $25^\circ\text{C}$ , pH 10, empleando:

- 250 ml de una solución conteniendo bicarbonato de sodio 100 mM, el cual provee el pH óptimo para la unión de la enzima al soporte, y glicerina al 25% (v/v) que protege la enzima favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre proteínas, previniendo su desplegado,
- una relación de 25 y 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml.

Esta mezcla se mantiene en agitación durante 3 horas. A lo largo de este período de tiempo se obtienen muestras a cada hora, y se mide actividad enzimática.

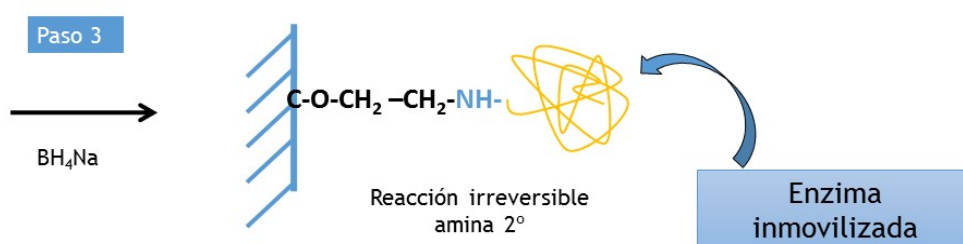
La reacción entre el grupo aldehído de la glioxil agarosa y el grupo amino de la enzima (Lys), se producirá cuando el amino se encuentre en forma no ionizada. Por esta razón es que la reacción debe realizarse a pH 10. El pKa de la Lys es 10,8 con lo cual a pH 10 existe una alta proporción de moléculas en forma no ionizada (a  $\text{pH} > \text{pKa}$  existen la forma no ionizada).



**Figura M.3:** Unión de la enzima a glioxil agarosa y formación de base de Schiff

El enlace tipo Base de Schiff es un enlace reversible (en el que se encuentran en equilibrio la forma glioxil agarosa, con la forma unida por doble enlace a la enzima). Por eso sería conveniente que la unión entre el soporte y la enzima se produzca al menos en 2 sitios, para procurar que incluso en el equilibrio tengamos un punto unido. Sin embargo, desde el punto de vista dinámico-estructural es conveniente que la enzima se encuentre unida al soporte en un único enlace, así posee la movilidad necesaria para accionar correctamente.

Luego del transcurso de las 3 horas, se incorpora borohidruro de sodio manteniendo la agitación durante 30 min con el recipiente destapado para permitir la salida del  $\text{H}_2$  desprendido de la reacción.



**Figura M.4:** Reducción del enlace de la base de Schiff entre la enzima y la glioxil-agarosa.

El  $\text{NaBH}_4$  reduce el doble enlace reversible de la base de Schiff, obteniendo un enlace amina, esta reacción desprende hidrógeno en cuanto se le pone en contacto con el agua. Los grupos glioxil que no han reaccionado con la enzima son reducidos a alcohol.

Luego se lava con abundante agua destilada en embudo de vidrio fritado. Por último se lava con buffer adecuado para mantener la enzima en condiciones óptimas.

### **M.9 Purificación cromatográfica de inhibidores de CPA desde el EC**

Se realizó una cromatografía de afinidad con CPA inmovilizada en glioxil-agarosa. El extracto crudo y los tratamientos térmicos fueron clarificados por centrifugación durante 60 min a 15000  $xg$  y a 4°C. Se sembraron 50 ml del EC en la columna cromatográfica y fueron eluidos a una velocidad de 1ml/min, luego se lavó la misma con buffer de reacción de CPA (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 7,2) recolectando la fracción no retenida y midiendo la absorbancia a 280 nm hasta llegar a 0 de absorbancia. Finalmente, la fracción retenida fue eluida con un descenso progresivo del pH, cambiando el buffer de elución primero por HCl a pH 5 y luego HCl a pH 3 para lograr la desestabilización del complejo CPA-inhibidor. Para conservar la columna, la misma fue lavada con Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,2 M, pH 7,2.

A cada una de las fracciones eluidas se les determinó actividad inhibitoria y concentración de proteínas.

Este soporte conteniendo a la enzima inmovilizada, atrapada mediante uniones covalentes (base de Schiff entre el grupo amino libre de la proteína y el grupo aldehído de la glioxil-agarosa), puede ser reutilizado en muchas aplicaciones ya que se ha demostrado que la enzima permanece unida y activa.

### **M.10 Electroforesis de Alta Resolución con Tris-Tricina (AR SDS-Tricina-PAGE)**

Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina. Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo

en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C, un gel espaciador (10% T y 3% C) y un gel de resolución (16,5% T y 6% C).

$\%T = (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}) \times 100 / \text{volumen total}$

$2\%C = g \text{ bis-acrilamida} \times 100 / (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida})$

#### Preparación de las muestras

El extracto crudo sin tratar y los extractos crudos tratados térmicamente y liofilizados se redisolviaron en buffer de muestra 6x para electroforesis y se llevaron a ebullición durante 5 min.

#### Buffer de muestra 6x:

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Tris                          | 9,42 g   |
| SDS                           | 12,00 g  |
| Mercaptoetanol                | 30,00 ml |
| Glicerol                      | 48,00 ml |
| Azul de bromofenol            | 12,00 mg |
| Se llevó a pH 6,8 con HCl 1 M |          |
| Agua destilada, c.s.p.        | 100 ml   |

#### Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III Bio-Rad. La composición de los buffers y de los geles se indica a continuación:

#### Buffer del gel:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Tris                   | 36,3 g  |
| SDS                    | 0,3 g   |
| HCl 1 M, c.s.p.        | pH 8,45 |
| Agua destilada, c.s.p. | 100 ml  |

#### Gel de apilamiento (4%T, 3%C):

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Acril-Bis (49,5:3) | 0,40 ml |
|--------------------|---------|

|   |         |
|---|---------|
| Buffer del gel                            | 1,25 ml |
| Agua destilada                            | 3,40 ml |
| PSA (Persulfato de Amonio) 10%            | 0,04 ml |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) | 7 µl    |

Gel de resolución (16,5%T, 3%C):

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Acril-Bis (49,5:3) | 3,3 ml  |
| Buffer del gel     | 3,3 ml  |
| Agua destilada     | 3,4 ml  |
| PSA 10%            | 0,04 ml |
| TEMED              | 7 µl    |

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Se aplicaron las muestras y en los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Buffer Anódico 2 M:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Tris                   | 24,2 g  |
| HCl 1 M, c.s.p.        | pH 8,9  |
| Agua destilada, c.s.p. | 1000 ml |

Buffer Catódico 1 M:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Tris                   | 12,1 g  |
| Tricina 0,1 M          | 17,9 g  |
| SDS 0,1%               | 1,0 g   |
| Agua destilada, c.s.p. | 1000 ml |

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 105 V al ingresar las proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

### Fijación y Tinción:

#### Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250:

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

#### Solución fijadora:

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Acido acético glacial | 100 ml  |
| Metanol               | 400 ml  |
| Agua destilada, c.s.p | 1000 ml |

#### Solución colorante:

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Acido acético glacial          | 100 ml  |
| Coomassie brilliant blue R-250 | 250 mg  |
| Agua destilada, c.s.p.         | 1000 ml |

#### Solución decolorante:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Acido acético glacial  | 100 ml  |
| Agua destilada, c.s.p. | 1000 ml |

#### Tinción con Coomassie Coloidal

La tinción de proteínas por este método (Neuhoff 1988) provee niveles de detección en el orden de los ng de proteínas. Las condiciones del medio en el que se encuentra el colorante (alta concentración salina en un medio acuoso-metanólico) le confiere un carácter coloidal que reduce en gran medida la coloración inespecífica de fondo (background) debido a un efecto hidrofóbico que al mismo tiempo hace aumentar su afinidad por las proteínas fijadas en el gel. Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo.

#### Solución colorante:

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Sulfato de amonio              | 17,0 g  |
| Ácido acético glacial          | 0,5 ml  |
| Metanol                        | 34,0 ml |
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 0,1 g   |
| Agua destilada, c.s.p.         | 100 ml  |

#### Patrones de Peso Molecular

Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Nº cat. 161-0377) Bio Rad.

Mezcla de doce proteínas recombinantes entre 2 y 250 kDa, incluyendo nueve que se observan de color azul y tres en color rosa (2, 25 y 75kDa). Los pesos moleculares observado son: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10, 5 y 2.

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Nº cat. LC5925) Novex. Thermo Fisher.

Mezcla de diez proteínas entre 3 y 198 kDa, ocho de ellas se observan en color azul y dos en color rojo, rosado (98 y 17 kDa). Los pesos moleculares observados son: 198, 98, 62, 49, 38, 28, 17, 14, 6 y 3.

LMW-SDS Marker (Nº cat. 17-0446-01) GE Healthcare.

Marcador de peso molecular compuesto por una mezcla de proteínas desde 14,4 a 97 kDa. Las proteínas que lo componen son las siguientes:

| Proteína                     | Mr(kDa) |
|------------------------------|---------|
| <b>Fosforilasa b</b>         | 97,0    |
| <b>Albúmina</b>              | 66,0    |
| <b>Ovoalbúmina</b>           | 45,0    |
| <b>Anhidrasa carbónica</b>   | 30,0    |
| <b>Inhibidor de tripsina</b> | 20,1    |
| <b>α-Lactoalbúmina</b>       | 14,4    |

### **M.10.1 Transferencia a membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno)**

La secuenciación proteica de EDMAN requirió de la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF. Para realizarlo se utilizó el siguiente buffer de transferencia:

Tris-Glicina, pH 8,5

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Tris base           | 3,0 g   |
| Glicina             | 14,4 g  |
| Metanol             | 100 ml  |
| Agua MiliQ c. s. p. | 1000 ml |

Luego de la corrida electroforética se preparó el “sándwich” para realizar la transferencia, el cual consta de:

-una membrana de PVDF activada en metanol durante 10 seg y sumergida en buffer de transferencia.

-el gel.

-cuatro trozos de papel Whatman y dos esponjas, sumergidas en buffer de transferencia, durante 15 min.

El sándwich fue sumergido en el buffer de transferencia contenido en la cuba de transferencia y se inició el proceso.

Condiciones de transferencia:

-4 h a 200 mA

#### Tinción de la membrana

Para la tinción se utilizó la siguiente solución: Coomassie G-250 0,5%, metanol 50% y ácido acético 10%. Se mantuvo la membrana en la solución colorante durante 5 min y luego se realizaron tres lavados con una solución de metanol 40%, ácido acético 10%, reemplazando la solución cada 20 min. Se dejó secar la membrana y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su envío al servicio de secuenciación.



## **M.11 Isoelectroenfoque**

El isoelectroenfoque (IEF) (Westergaard, Hackbarth et al. 1980) es un método de alta resolución en el cual las proteínas son separadas en un gradiente continuo de pH cuando se aplica un campo eléctrico. En este gradiente las proteínas migran hasta llegar al pH correspondiente a su punto isoeléctrico (pI). Esta técnica permite resolver muestras muy complejas y determinar diferentes valores de pI en una misma corrida, tanto en trabajos analíticos como preparativos.

### Preparación de las muestras

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 µg/µl y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a liofilizar las mismas (con excepción del extracto crudo) y luego a redissolver el precipitado en agua bidestilada. En el caso de muestras con alto contenido proteico como el EC y el tratamiento térmico a 60°C el volumen final de siembra se redujo respecto al de las demás de modo de lograr una concentración adecuada. Luego, estas muestras fueron conservadas en freezer a -80°C hasta el momento de ser sometidas a IEF.

### Preparación de los geles

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Para obtener dos geles fue necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

#### Solución de poliacrilamida al 5%:

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| Acrilamida-bisacrilamida (25%T, 3%C) | 2,0 ml |
| Agua MQ                              | 5,5 ml |
| Anfolitos (Bio-Lyte 3/10)            | 0,5 ml |

Glicerol (25% p/v)

2,0 ml

La solución de poliacrilamida se degasificó en un kitasato conectado a una bomba de vacío durante aproximadamente 20 min y luego se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización:

Reactivos de polimerización:

Riboflavina (solución saturada) 100 µl

TEMED 5 µl

PSA al 10% 70 µl

La mezcla fue depositada con micropipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo tapado e inmóvil durante toda la noche a temperatura ambiente y en ausencia de luz para obtener la polimerización total. Al cabo de ese tiempo, los geles se removieron cuidadosamente con ayuda de una espátula delgada.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 5-12 µl realizando 9 siembras por placa como máximo), permitiendo que las mismas difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con agua destilada) de la celda de IEF, con la cara del gel sembrado hacia abajo. La celda se cerró herméticamente y se conectó a la fuente de poder.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas, a voltaje constante: 100 V durante los primeros 30 min, 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales.

Fijación y coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 min en la siguiente solución fijadora:

Solución fijadora:

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Acido sulfosalicílico       | 4,0 g  |
| Metanol                     | 30 ml  |
| TCA (Ácido Tricloroacético) | 12,5 g |
| Agua destilada, c.s.p.      | 100 ml |

Finalizada la etapa anterior, los geles se trataron durante 2 h con la solución colorante y luego fueron decolorados mediante tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución colorante:

|   |        |
|---|--------|
| CuSO <sub>4</sub> (se disolvió primero en agua) | 500 mg |
| Acido acético glacial                           | 10 ml  |
| Etanol  | 27 ml  |
| Coomassie brilliant blue R-250                  | 40 mg  |
| Agua destilada, c.s.p.                          | 100 ml |

Solución decolorante I:

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Acido acético glacial  | 7 ml   |
| Etanol                 | 2 ml   |
| CuSO <sub>4</sub>      | 500 mg |
| Agua destilada, c.s.p. | 100 ml |

Solución decolorante II:

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Acido acético glacial  | 7 ml   |
| Etanol                 | 12 ml  |
| Agua destilada, c.s.p. | 100 ml |

Estimación de los puntos isoelectricos

Para la determinación de los puntos isoelectricos (pIs) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar los siguientes patrones:

La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

#### Componentes de los kit de calibración de pI GE Healthcare

| Kit                                | Proteína                       | pI (Nativo) |
|------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| Rango amplio de pI<br>(pI 3,5-9,3) | Amilglucosidasa                | 3,50        |
|                                    | Tojo de Metilo (dye)           | 3,75        |
|                                    | Inhibidor de tripsina          | 4,55        |
|                                    | $\beta$ -Lactoglobulina A      | 5,20        |
|                                    | Anhidrasa carbónica B (bovina) | 5,85        |
|                                    | Anhidrasa carbónica B (humana) | 6,55        |
|                                    | Mioglobina, banda acidica      | 6,85        |
|                                    | Mioglobina, banda básica       | 7,35        |
|                                    | Lentil lectina, acidica        | 8,15        |
|                                    | Lentil lectina, mediana        | 8,45        |
|                                    | Lentil lectina, basica         | 8,65        |
|                                    | Tripsinógeno                   | 9,30        |
| Rango bajo de pI<br>(pI 2,8-6,5)   | Pepsinógeno                    | 2,80        |
|                                    | Amilglucosidasa                | 3,50        |
|                                    | Rojo de metilo (dye)           | 3,75        |
|                                    | Glucosa oxidasa                | 4,25        |
|                                    | Inhibidor de tripsina          | 4,55        |
|                                    | $\beta$ -Lactoglobulina A      | 5,20        |
|                                    | Anhidrasa carbónica B (bovina) | 5,85        |
| Rango alto de pI<br>(pI 5,2-10,3)  | Anhidrasa carbónica B (humana) | 6,55        |
|                                    | $\beta$ -Lactoglobulina A      | 5,20        |
|                                    | Anhidrasa carbónica B (bovine) | 5,85        |
|                                    | Anhidrasa carbónica B (human)  | 6,55        |
|                                    | Mioglobina, acidica            | 6,85        |
|                                    | Mioglobina, basica             | 7,35        |
|                                    | Lentil lectina, acidica        | 8,15        |
|                                    | Lentil lectina, mediana        | 8,45        |

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Lentil lectina, basica | 8,65  |
| Tripsinógeno           | 9,30  |
| Citocromo C            | 10,25 |

## **M.12 Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF)**

La espectrometría de masas MALDI-TOF descrita inicialmente por Hillenkamp (Hillenkamp and Karas 1990) es una técnica precisa y muy sensible para la determinación de masas moleculares de hasta 200000 Da. La técnica consiste en mezclar la muestra a ser determinada con una matriz, la cual es introducida al espectrómetro de masas e irradiada con un láser pulsátil al máximo de absorción de la matriz. La interacción de los fotones con la matriz y la muestra resulta en la formación de iones intactos relacionados con la masa molecular de la muestra, que en nuestro caso es una proteína. Este mecanismo acoplado con un espectrómetro de masas TOF (del inglés Time Of Flight, tiempo de vuelo) permite calcular las masas de la muestra basado en el tiempo que tarda el ión formado en recorrer la distancia entre el lugar de formación del ión y el detector. El cuadrado de este tiempo es proporcional a la masa del ión e inversamente proporcional a la carga del mismo. Esta técnica tiene una sensibilidad demostrada de detectar masas de hasta 200000 Da de muestras de apenas 5 pmol.

$m/z$  (Relación masa/carga) proporcional  $(\text{tiempo de vuelo})^2$

$m$ = masa molecular

$z$ = carga de la molécula

El error típico en esta técnica es de alrededor de 10 Da en masas de 10000 Da o de 50 Da para masas de 50000 Da. Este tipo de espectrometría es una medida de la masa química de la molécula, por ende no es afectada por las propiedades físicas e hidrodinámicas de la proteína como pasa con técnicas como el SDS-PAGE (Electroforesis Desnaturalizante en Geles de Poliacrilamida). Otra ventaja del MALDI es que es que puede utilizarse en

cualquier etapa de la purificación de proteínas proporcionando una herramienta rápida para el diagnóstico del analito (Beavis and Chait 1989).

### **M.12.1 Métodos proteómicos**

Los métodos proteómicos de esta tesis fueron llevados a cabo en el Servicio de Proteómica y Biología Estructural (SePBioEs), en las instalaciones de Proteómica de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

### **M.12.2 Intensity Fading (IF) por MALDI-TOF MS**

El Intensity Fading (IF) es un procedimiento muy versátil que se utiliza para la de detección, el seguimiento, la identificación o el análisis estructural de analitos; ya que se manejan muchas variables operativas según las muestras y reactivos que se utilicen.

El método fue desarrollado para identificar inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con las proteasas que inhibe. La formación del complejo se detecta mediante la atenuación total o parcial de la intensidad iónica molecular de una proteína, después de adicionar su contraparte molecular, cuando se compara con un espectro de masas control de la muestra inicial. Una variante desarrollada posteriormente, incluye una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la micropartícula puede ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corrobora la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas. Esta metodología ha permitido identificar IPP en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

- Desalado de los extractos

Los extractos biológicos fueron desalados y concentrados como fue descrito por (Villanueva J. 2003). Para ello, la matriz de C18 fue activada con acetonitrilo, luego se eliminó y se lavó varias veces con agua, a continuación se añadió la muestra, se mezcló por agitación y se centrifugó a 15000 g durante 30 segundos. Por último, los péptidos y proteínas vinculados a la resina de C18 se eluyeron con isopropanol-TFA 0,1%, mezclando por agitación y centrifugando a 15000 g durante 1 min. El sobrenadante de la última etapa se utilizó para análisis por MALDI-TOF MS.

- Condiciones experimentales para IF MALDI-TOF MS

Los experimentos de Intensity Fading MALDI-TOF MS (Espectrometría de Masas Laser de Desorción/Ionización Asistida por Matriz- Analizador de Tiempo de Vuelo) fueron llevados a cabo utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Para el análisis, la muestra biológica (1 µl) fue mezclada con una solución de ácido sinapínico en TFA 0,1% (2 µl) como matriz y luego fue depositada sobre una placa de siembra (polished steel) y se dejó secar a temperatura ambiente (Hillenkamp and Karas 1990, Alonso-del-Rivero 2009).

Procedimiento: La muestra fue sometida (previamente al análisis por MALDI-TOF MS) a una cromatografía de afinidad usando enzimas inmovilizadas en resinas tales como agarosa 10 BCL activada con glicidol (Guisan 2006) y Sepharose® 4B activada con CNBr (Yanes 2007). El procedimiento adecuado indica en primera instancia, analizar los extractos desalados (previos a la cromatografía de afinidad) por MALDI-TOF MS a fin de obtener un espectro de masas control. Luego, los extractos fueron sometidos a una cromatografía de afinidad con proteasas inmovilizadas. La cromatografía de afinidad nos brindará fracciones no retenidas y fracciones retenidas que serán sometidas a un nuevo análisis de MALDI-TOF MS. para verificar la presencia del inhibidor que se ha unido a la matriz (Yanes 2005).

### **M.12.3 Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprinting)**

La huella peptídica o Peptide Mass Fingerprinting (PMF) es una técnica analítica para la identificación de proteínas. Un aspecto clave para el PMF es que el genoma del organismo u organismos similares debe ser conocido y estar disponible en base de datos, o si se dispone de la información necesaria de proteínas y genes de organismos similares a los que uno estudia. En la técnica del PMF, la proteína de interés desconocida es cortada en péptidos por una enzima (una de las más usadas es la tripsina) que no genera muchos péptidos (solo corta en Arginina y Lisina). La masa absoluta (todavía sin saberse) de estos péptidos es determinada por espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF MS). La gran ventaja de este método para la identificación de proteínas es que sólo se debe saber las masas de los péptidos. El principal inconveniente es que la auténtica secuencia proteica (u homóloga cercana) debe estar presente en las bases de datos disponibles o disponer de la información de secuencia proteica necesaria.

- Digestión triptica

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y visualizadas por tinción de los geles de acuerdo al método de Coomassie coloidal. Las bandas seleccionadas fueron cortadas, lavadas con agua Milli-Q y acetonitrilo varias veces para remover el colorante y secadas en vacío. Los fragmentos del gel fueron cubiertos por una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM conteniendo DTT 10 mM por 30 min a 37°C, luego fueron centrifugadas y lavadas con acetonitrilo por 5 min. Los fragmentos fueron incubados en una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM conteniendo iodoacetamida 50 mM por 20 min a temperatura ambiente y oscuridad, y lavados con agua Milli-Q y acetonitrilo alternativamente. La digestión triptica fue lograda usando buffer  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pH 8,5 conteniendo tripsina (4 ng/ $\mu\text{l}$ ) por 12 h a 37°C. Los péptidos resultantes fueron recuperados por extracción con acetonitrilo al 50% (v/v) y luego secados en un SpeedVac, redisueltos en TFA al 0,1% (v/v).



Otra alternativa es realizar digestión triptica de otras muestras que no provengan de bandas electroforéticas. En este caso primero se hace un desalado de la muestra y luego se prosigue como se describe anteriormente desde el agregado de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM conteniendo DTT 10 mM por 30 min a 37°C.

- PMF por MALDI-TOF MS

Los péptidos, productos de la digestión triptica, fueron sembrados en una placa ground steel MP 384 utilizando como matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (4-HCCA) y fueron analizados por MALDI-TOF MS. La identificación del mapa triptico se intentó obtener usando el programa “Mascot tool” (<http://www.matrixscience.com>) según los siguientes parámetros de búsqueda: (1) Tipo de búsqueda, Peptide mass fingerprinting; (2) Enzima, tripsina; (3) Base de datos, SwissProt 55.2; (4) Taxonomía, Viridiplantae; (5) Modificaciones variables, Metilcarbamida (C), Oxidación (M); (6) Valores de masas, monoisotópico; (7) Peso de la proteína, 4,2 kDa; (8) Tolerancia del peso de la proteína,  $\pm$  1000 ppm; (9) Carga de la proteína, +1. Valor de probabilístico de MOWSE: El valor de la proteína es  $-10 \cdot \log(P)$ , donde P es la probabilidad que el apareamiento observado es un evento al azar (Obregon 2009, Obregon 2009).

- Secuenciación de *novo* por MS/MS

Mediante este tipo de secuenciación se logra revelar la información secuencial de una proteína mediante la fragmentación de péptidos intactos dentro de un espectrómetro de masas. Esta información puede ser revelada incluso cuando los genomas son desconocidos, ya que pueden conocerse secuencias parciales de proteínas en bases de datos de proteínas conocidas (Hughes C. 2010).

En el proceso de secuenciación de *novo* por MS/MS (Espectrometría de Masas en Tándem), los iones generados por el proceso de PMF-MALDI-TOF MS fueron acelerados a 8 kV a través de una rejilla a 6,7 kV en una región de desplazamiento libre de campo, corta y lineal. En ésta región, los iones pasaron a través de un dispositivo selector de iones temporizados que fue capaz de

seleccionar un péptido de una mezcla de péptidos que estaban a diferentes valores de  $m/z$  para fragmentaciones subsecuentes en la celda de colisión. Después de que fueron seleccionadas varias moléculas de un tipo de péptido a un determinado valor de  $m/z$  por el selector de iones temporizados, las mismas pasaron a través de un lente de retardo donde los iones fueron desacelerados y luego introducidos dentro de la celda de colisión, que fue operada a 7 kV. Fue llevada a cabo la fragmentación en el modo de simple descomposición metaestable (sin gas de colisión y con la energía de colisión configurada a 1 keV).

### **M.13 Secuenciación mediante EDMAN**

Con el objetivo de obtener la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de un inhibidor de carboxipeptidasa presente en nuestros extractos nos pusimos en contacto con el servicio de secuenciación Lanais-Pro de la Facultad de Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se realizó una transferencia de las bandas de proteínas obtenidas en un gel de poliacrilamida al 16% a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), según el protocolo de Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang, 2012.

La membrana fue teñida con:

Coomassie G-250: 0,1% en metanol 50% y ácido acético 1% durante 1 min.

Decoloración: metanol 50% durante 5 min, por duplicado y luego varios lavados con agua Milli-Q.

La membrana fue secada, envuelta con papel plástico y mantenida a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta ser llevado al Servicio de Secuenciación y su posterior análisis.

### **M.14 Métodos de biología molecular**

#### **M.14.1 Aislamiento de ARN a partir de material vegetal**

Con el fin de extraer ARN (Ácido Ribonucleico) de *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad Churqueña se congelaron aproximadamente 100 mg. de brotes de papa a  $-80^{\circ}\text{C}$  y luego se obtuvo un polvo del material vegetal

utilizando un mortero y N<sub>2</sub> líquido. Luego se procedió siguiendo las indicaciones del kit de extracción RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). El ARN obtenido se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

#### M.14.2 Obtención de ADNc: (3'RACE PCR)

Previo a la reacción de retrotranscripción (RT), el ARN fue sometido a un tratamiento térmico (15 min a 65°C y 5 min en baño de hielo) para provocar la ruptura de su estructura secundaria.

Para obtener el ADNc (Ácido Desoxiribonucleico complementario) a partir de ARNm se empleó la reacción de RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa) utilizando el primer R<sub>0</sub>R<sub>1</sub>-poli(dT) y la enzima M-MuLV (Fermentas):

| Primer                               | Secuencia  |
|--------------------------------------|--|
| R <sub>0</sub> R <sub>1</sub> polidT | CCGGAATTCAGTGCAGGGTACCAATACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTT |

Los productos de reacción se analizaron en gel de agarosa y se continuó con la obtención las secuencias específicas de inhibidores de CPA (Green M. R. 2012).

#### M.14.3 Obtención de la secuencia de un inhibidor de carboxipeptidasa A

Para obtener la secuencia nucleotídica de un inhibidor de carboxipeptidasa A, se diseñaron específicamente primers a partir de secuencias nucleotídicas de las regiones más conservadas del gen que codifica para el Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa (PCI) ya conocido. El primer Fw1 contiene la secuencia nucleotídica que corresponde al N-terminal del propéptido. Por su parte el primer Rv1 contiene la secuencia que corresponde al extremo C-terminal del PCI.

| Primer | Secuencia               |
|--------|-------------------------|
| Fw1    | ATTCTCCTTGTTGTTATTGCTGC |
| Rv1    | GCCACAAAGCATGTATCTAAGAC |

La reacción se llevó a cabo utilizando el siguiente programa:

| Ciclos | Tiempo | Temperatura |
|--------|--------|-------------|
| 1      | 2min.  | 94°C        |
| 27     | 15seg. | 94°C        |
|        | 30seg. | 47,4°C      |
|        | 30seg. | 72°C        |
| 1      | 2min   | 72°C        |

Los productos de reacción fueron purificados a partir de un gel de agarosa (1,5%) utilizando el kit de extracción de ADN (QIAEX II Agarose Gel Extraction, QIAGEN GmbH) y ligados al vector pGEM-T Easy (Promega) para ser clonados en la cepa XL1-Blue de *E. coli*. Los clones transformados se seleccionaron haciéndolos crecer en placas del medio LB (Luria Bertani)-agar conteniendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (Isopropil-β-D-1-tioalactopiranosido) (112 µg/ml) y X-Gal (80 µg/ml) en estufa de cultivo a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron las colonias blancas y el ADN plasmídico fue extraído utilizando el kit comercial GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE HealthCare, Biosciences). Los clones fueron enviados para su secuenciación al servicio de genómica Macrogen Inc., en Corea. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los programas ClustalW y BLAST: (Basic Local Alignment Search Tool).

#### M.14.4 Construcción de pIN-III-OmpA3-PCI Chu

La expresión de una proteína heteróloga requiere la inserción del gen que codifica la misma, en un vector de expresión para introducirlo en la bacteria o sistema de expresión elegido. El vector de expresión utilizado fue el pIN-III-OmpA3 (GenBank: AJ223123.1), que contiene el promotor del operón lac, en el cual se inserta el gen que codifica para la proteína de interés, posee además un fragmento de ADN que codifica para el péptido señal OmpA de modo que la proteína expresada sea secretada al medio extracelular (de esta forma los puentes disulfuro se forman correctamente y se facilita la purificación posterior.) y el gen de resistencia a ampicilina (Amp). Si bien la secuencia OmpA se encuentra en el vector, es difícil aprovecharla ya que no existen enzimas de

restricción que faciliten el corte y el ligado de la proteína a expresar. Por lo tanto, se adicionó mediante PCR la secuencia del OmpA a nuestro inhibidor y se reemplazó la secuencia OmpA3 que se encuentra en el vector.

Para generar el constructo pIN-III-OmpA3-PCI Chu a partir del ADNc obtenido, se utilizaron los siguientes primers.

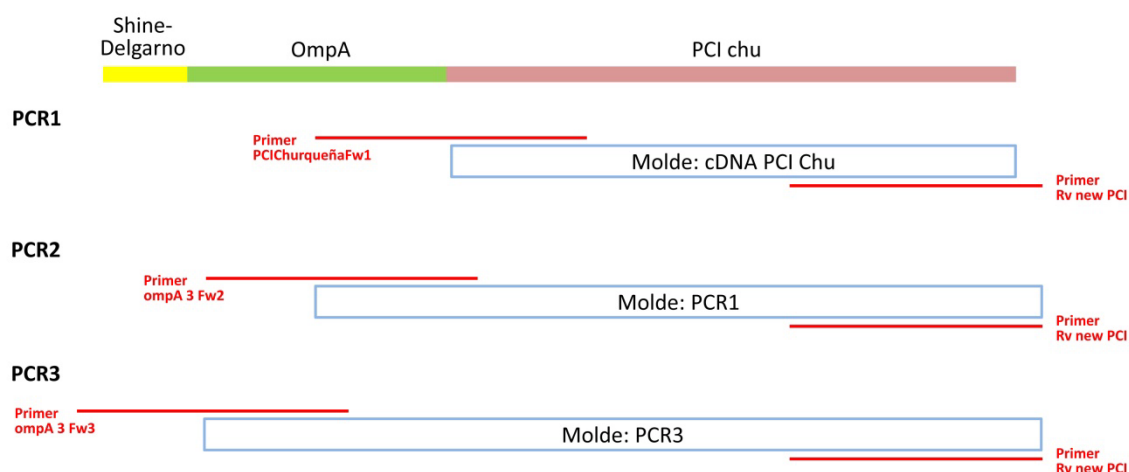
| Primer           | Secuencia  |
|------------------|--|
| >PCIChurqueñaFw1 | CTACCGTAGCGCAGGCC <b>CAGCGAGACCCGGATCC</b>                           |
| >Rv new PCI      | GTCAGAATTCCTA <b>GCCAACATAGGGCCCACATG</b>                            |
| >ompA 3 Fw2      | <b>GCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCG</b> CTACCGTAGCGCAGGCC          |
| >ompA 3 Fw3      | <b>TCTAGATAACGAGGGCAAAA</b> <b>AATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGC</b> |

**XXX** Stop

**XXXXXX** sitio de corte de XbaI

**XXXXX** En esta región se encuentra la secuencia de unión a ribosoma o Shine-Delgarno GAGG.

La estrategia de clonado del PCI Chu en el vector pIN-III consiste en una serie de PCR recursivas con la utilización de una serie de primers solapantes, cuya finalidad es adicionar la secuencia OmpA en el extremo N-terminal del PCI Chu y las enzimas de restricción para el clonado (Figura M.5). Observando la tabla de primers, las secuencias resaltadas en rojo son secuencias mediante las cuales se realiza la interacción o *annealing* a la secuencia del inhibidor maduro determinado en el análisis de la secuencia de ADNc. La secuencia en color turquesa corresponde al péptido señal OmpA generado. Se realizó una primer PCR con los primers PCIChurqueñaFw1 y Rv new PCI, utilizando como molde el vector pGem-T Easy que contiene el ADNc del PCI Chu (Figura M.5). Ese producto fue purificado desde un gel de agarosa al 1,5%, y utilizado como molde para la siguiente PCR (PCR2), en la que se usaron los primers ompA 3Fw2 y Rv new PCI. Nuevamente se purificó este producto y se utilizó como molde para la siguiente PCR (PCR3) utilizando el último par de primers, ompA3 Fw3 y Rv new PCI (Figura M.5).



**Figura M.5:** Estrategia de clonado del PCI Chu en el vector pIN-III. Serie de PCR recursivas para generar las secuencias de unión a ribosoma, OmpA y la secuencia del inhibidor.

El producto de PCR3 fue ligado al vector de clonado pGEM-T Easy, transformado en *E. coli* (XL1Blue) y plaqueado en placas conteniendo LB-agar con Amp (LB-Amp) en una concentración de 100 µg/ml. Una vez obtenidos los clones, fueron enviados a secuenciar para comprobar la correcta secuencia del constructo. Una vez seleccionado el clon de interés, se purificó el plásmido mediante miniprep (Gene JET Plasmid Miniprep kit, Thermo Scientific) y se realizó una digestión con las enzimas de restricción XbaI y SalI (sitio que se encuentra en el vector pGem-T Easy) del constructo obtenido en la PCR 3 en el vector pGem Teasy y del vector de expresión pIN-III-OmpA3. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y posteriormente fueron extraídos del gel mediante un kit de purificación (Gene JET Extraction Kit, Thermo Scientific).

Finalmente se obtuvo la construcción para la expresión pIN-III-OmpA3-PCIChu mediante la ligación de los productos de digestión utilizando la enzima ADN Ligasa del fago T4. Se transformó el constructo en *E. coli* XL1Blue, se obtuvieron clones y se enviaron a secuenciar. Una vez ubicados los clones con la correcta inserción del constructo, se purificó el plásmido pIN-III-OmpA3-PCI Chu, el cual fue transformado en células de *E. coli* BL21(DE3) y las bacterias que incorporaron el constructo seleccionadas en placas de LB-Amp.

#### M.14.5 Construcción de un potencial inhibidor determinado a partir de la secuenciación mediante la técnica de EDMAN: StcCI

Luego de la determinación de un potencial inhibidor de CPA utilizando técnicas bioinformáticas, se expresó en forma recombinante dicha molécula. La secuencia para esa expresión recombinante se construyó mediante una serie de PCR recursivas con la utilización de primers solapantes para sintetizar la secuencia del StcCI a ser expresada (Figura M.6). En una segunda parte de esta estrategia se realizó una PCR que se denomina Overlap extension PCR (Heckman and Pease, 2007), para adicionar la secuencia OmpA en el extremo N-terminal del StcCI y las enzimas de restricción para el clonado (Figura M.6). El vector de expresión que se utilizó fue el mismo que el utilizado para la expresión de PCI Chu: pIN-III-OmpA3.

El potencial inhibidor a expresar posee la siguiente secuencia primaria:

TCNDYCNTNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP

Se utilizó el siguiente servidor de internet <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>, para generar una secuencia de ADN que codifique para este inhibidor y que tenga un uso de codón optimizado para *E. coli*. La secuencia que se obtuvo es la siguiente: ACCTGCAACGACTACTGCAACACCAACGCGGACTGCTTCGGTATCACCCCTGTGCCCCGTGGTGCAAACCTGAAAAAATCTTCTTCTGGTTTCACCTACTCTGAA TGCTCTCTGCTGCCG.

A la secuencia de ADN que codifica la molécula a ser expresada se le incorporaron las siguientes secuencias:

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| XXX | sitio de restricción XbaI     |
| XXX | sitio de restricción EcoRI    |
| XXX | StcCI                         |
| XXX | Secuencia OmpA                |
| XXX | Secuencia de unión a ribosoma |

La secuencia final del constructo es:

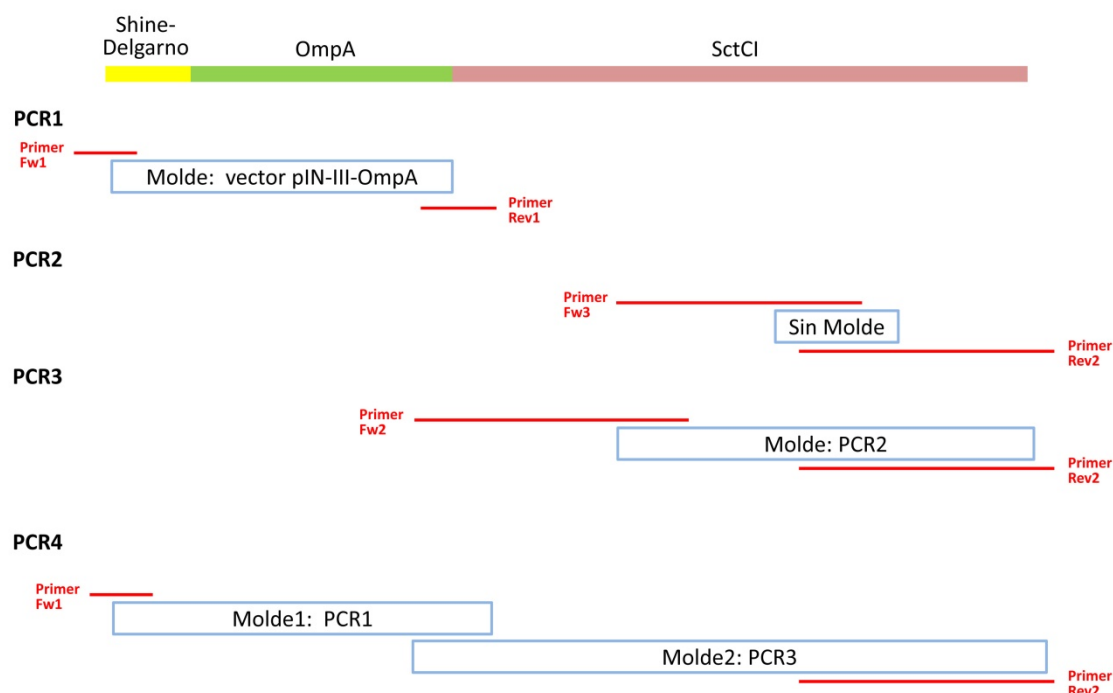
TCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTT  
 TCGCTACCGTAGCGCAGGCCACCTGCAACGACTACTGCAACACCAACGCGGACTGCTTCGGTAT  
 CACCCTGTGCCCGTGGTGCAAACCTGAAAAAATCTTCTTCTGGTTTCACCTACTCTGAATGCTCT  
 CTGCTGCCGTAA GAATTC

Los sitios de restricción XbaI y EcoRI fueron utilizados para incorporar el inhibidor al vector pIN-III-OmpA3. La secuencia en color turquesa es el péptido señal OmpA que se agrega para que el inhibidor sea secretado al periplasma. Dicha construcción se realizó empleando los siguientes primers y el vector de expresión pIN-III-OmpA3:

| Primer | Secuencia   |
|--------|---|
| Fw1    | CAGATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATG                                |
| Rev 1  | GTAGTCGTTGCAGGTGGCCTGCGCTACGGTAGC                           |
| Fw2    | ACCTGCAACGACTACTGCAACACCAACGCGGACTGCTTCGGTATCACCCTGTGCCCGTG |
| Fw3    | CACCCTGTGCCCGTGGTGCAAACCTGAAAAAATCTTCTTCTGGTTTCACCTACTCTGA  |
| Rev3   | AGTCGAATTC TTACGGCAGCAGAGAGCATT CAGAGTAGGTGAAAC             |

Se realizaron 4 PCR como se observa gráficamente en la Figura M.6, purificando cada vez los productos de PCR desde geles de agarosa ya explicados en métodos anteriores.





**Figura M.6:** Estrategia de construcción de StcCI con las secuencias de unión a ribosoma y OmpA incorporadas.

Luego se digirió el vector pIN-III-OmpA3 y el fragmento obtenido de la PCR4 con XbaI y EcoRI. Se purificaron los fragmentos y fueron ligados durante 20 h. Se transformó la construcción en *E. coli* TOP10 y se realizaron minipreps de las colonias obtenidas. Por último, se envió a secuenciar para comprobar la correcta secuencia. Para luego realizar la expresión, se obtuvo nuevamente el plásmido por miniprep y se transformó en *E. coli* BL21. La expresión de esta molécula se realizó de igual forma que la expresión del PCI Chu.

#### M.14.6 Construcción de la variante del StcCI: 5N-StcCI

En base al estudio realizado en las miniproteínas TCMP-1 y TCMP-2 (Cavallini C 2011), se decidió expresar una variante de StcCI con una extensión en el extremo N-terminal. La estrategia de construcción fue la misma que la utilizada para el StcCI, aunque en este caso se utilizó un primer Rev1 con la secuencia a ser adicionada en el N-terminal. En una primer etapa se realizaron una serie de PCR recursivas con la utilización de primers solapantes para sintetizar la secuencia del 5N-StcCI a ser expresada (Figura M.7) y en la

siguiente se realizo una PCR que se denomina Overlap extention PCR (Heckman and Pease, 2007), para adicionar la secuencia OmpA en el extremo N-terminal y las enzimas de restricción para el clonado.

La nueva construcción es la siguiente:

SNVLGTCNDYCNTNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP

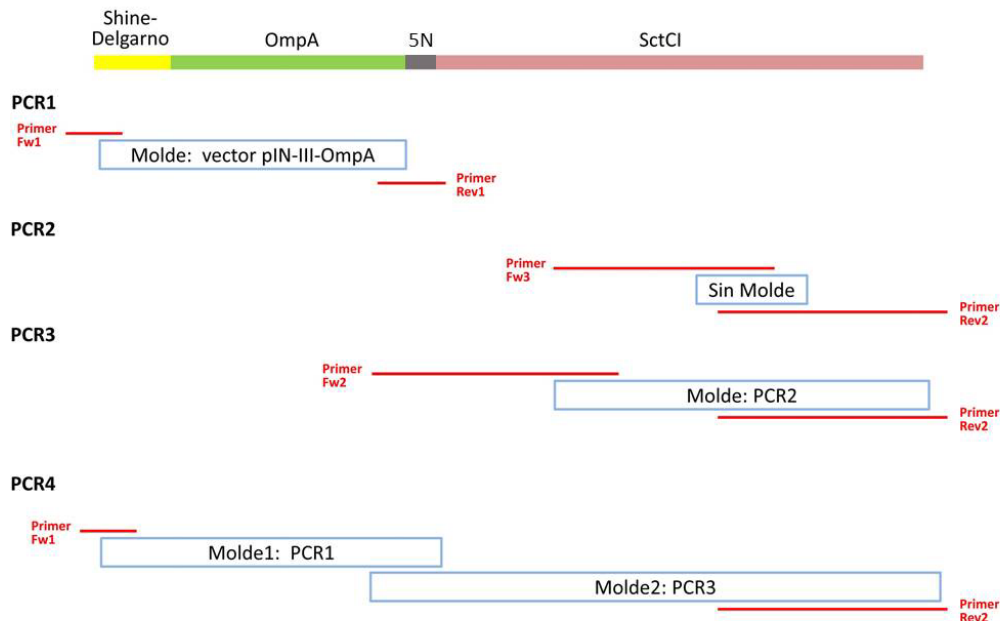
La secuencia final del nuevo constructo es:

TCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTT  
 TCGCTACCGTAGCGCAGGCCCTCTAACGTTCTGGGTACCTGCAACGACTACTGCAACACCAACGC  
 GGACTGCTTCGGTATCACCCGTGCCCCGTGGTGCAAACGAAAAATCTTCTTCTGGTTTCACC  
 TACTCTGAATGCTCTCTGCTGCCGTAA

- XXX sitio de restricción XbaI
- XXX sitio de restricción EcoRI
- XXX StcCI
- XXX Secuencia OmpA
- XXX Extensión del nuevo constructo
- XXX Secuencia de unión a ribosoma.

| Primer | Secuencia   |
|--------|---|
| Fw1    | CAGATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATG                                |
| Rev1   | GTAGTCGTTGCAGGTACCCAGAACGTTAGAGGCCTGCGCTACGGTAGC            |
| Fw2    | ACCTGCAACGACTACTGCAACACCAACGCGGACTGCTTCGGTATCACCCGTGCCCCGTG |
| Fw3    | CACCCTGTGCCCGTGGTGCAAACGAAAAATCTTCTTCTGGTTTCACCTACTCTGA     |
| Rev3   | AGTCGAATTCCTACGGCAGCAGAGAGCATTGAGAGTAGGTGAAAC               |

Se realizaron cuatro PCR como se observa gráficamente en la Figura M.7, purificando cada vez los productos de PCR desde geles de agarosa ya explicados en métodos anteriores.



**Figura M.7:** Estrategia de construcción de 5N-StcCI con las secuencias de unión a ribosoma y OmpA incorporadas.

Luego se digirió el vector pIN-III-OmpA3 y el fragmento obtenido de la PCR4 con XbaI y EcoRI. Se purificaron los fragmentos y fueron ligados durante 20 h. Se transformó la construcción en *E. coli* TOP10 y se realizaron minipreps de las colonias obtenidas. Por último, se envió a secuenciar para comprobar la correcta secuencia. Para luego realizar la expresión, se obtuvo nuevamente el plásmido por miniprep y se transformó en *E. coli* BL21. La expresión de esta molécula se realizó de igual forma que la expresión del PCI Chu y StcCI.

### M.15 Expresión de las proteínas recombinantes: PCI-Chu, StcCI y 5N-StcCI

La expresión de estas proteínas fue llevada a cabo tomando una de las colonias de BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pIN-III-OmpA-3 con la proteína a expresar: pIN-III-OmpA-3-PCI-Chu, pIN-III-OmpA-3-StcCI y pIN-III-OmpA-3-5N-StcCI en cada caso. Cada colonia de bacterias se hizo crecer en un tubo conteniendo 20 ml de medio líquido LB/Amp y se incubó a 37°C con agitación (250 rpm) durante 20 h. Pasado este tiempo, se agregaron 10 ml este cultivo a 500 ml de medio mínimo conteniendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,51 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,22 M, NH<sub>4</sub>Cl 0,18 M, NaCl 0,085 M, MgSO<sub>4</sub> 0,001 M, CaCl<sub>2</sub> 3x10<sup>-4</sup> M, Tiamina

0,001 M, glicerol 0,5%, casamino ácidos 0,2%,  $\text{FeSO}_4$   $1,4 \times 10^{-4}$  M,  $\text{MnSO}_4$   $6 \times 10^{-4}$  M,  $\text{CoCl}_4$   $1,5 \times 10^{-5}$  M,  $\text{ZnSO}_4$   $6,9 \times 10^{-6}$  M,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   $4,7 \times 10^{-6}$  M,  $\text{CuCl}_2$   $1,8 \times 10^{-6}$  M,  $\text{AlCl}_3$   $7,5 \times 10^{-6}$  M y  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $8,1 \times 10^{-6}$  M, pH 7,2, con 0,1 mg/ml ampicilina y luego se incubó a 37°C en agitación hasta una absorbancia a 600 nm de 0,6. Luego se realizó la inducción de la expresión adicionando 0,2 mM de IPTG y luego se continuó la incubación durante 20 h a 37°C. Se separaron las células del medio de expresión mediante centrifugación durante 20 min a 4°C y una velocidad de 11000xg.

### **M.15.1 Plegado (*folding*) de proteínas**

El correcto plegamiento de las proteínas permite que las mismas adquieran su función fisiológica de forma adecuada, por lo tanto, es un paso de consideración a la hora de obtener una proteína con su función fisiológica apropiada. El método utilizado para plegar cada proteína se realizó en base al de Lian 2003, utilizado también por Lufrano 2015 en el plegamiento de un PCI de papa andina. El mismo se realizó incubando el sobrenadante de la expresión en presencia de cisteína 4 mM y cistina 2 mM en agitación, a temperatura ambiente, durante 3 horas. Luego se incubó la muestra toda la noche a 4°C.

### **M.16 Purificación de PCI Chu, StcCI y 5N-StcCI**

Antes de la purificación cromatográfica, la muestra fue acidificada a pH 3,5 usando ácido cítrico saturado. Se mantuvo en frío, se centrifugó a 11000 xg durante 20 min y el sobrenadante obtenido fue filtrado en filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . La muestra fue inyectada en una columna conteniendo una matriz de intercambio catiónico, Streamline Direct HST (GE Healthcare Biosciences, Sweden) conectada a un sistema de purificación Äkta Purifier FPLC (GE Healthcare) previamente equilibrada con buffer citrato de sodio 100 mM (pH 3,5). Luego del lavado con el mismo buffer de equilibrado, se procedió a la elución de las moléculas que quedaron adheridas a la resina mediante un gradiente lineal de pH desde 3,5 a 8,5 con buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,5. El pico obtenido

se analizó por espectrometría de masas y luego se procedió a la purificación mediante gel filtración. La cromatografía de gel filtración se realizó inyectando la muestra en una columna HiloLoad 26/60 Superdex 30 prep grade (GE Healthcare) conectada a un sistema de purificación Äkta Purifier FPLC (GE Healthcare) equilibrada con buffer fosfatos 10 mM pH 7,5 a un flujo de 2,5 ml/min. El pico obtenido se concentró mediante tubos Amicon Ultra-15 3K (Millipore, Alemania) y se determinó la concentración de proteínas mediante absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción molar (PCI Chu:  $E_{0,1\%}$  de 2,97; StcCl:  $E_{0,1\%}$  1,965; 5N-StcCl:  $E_{0,1\%}$  de 1,85).

### **M.17 Estudio del plegado (*folding*) oxidativo de proteínas**

Este estudio se realizó sobre las proteínas StcCl y 5N-StcCl y fue basado en el artículo de (Bronsoms S. 2011). Para ello fueron incubados 0,2 mg de proteína en Tris-HCl 0,5M, pH 8,5 conteniendo Urea 8 M y DTT 100 mM en un volumen total de 1 ml, durante 2 a temperatura ambiente. Para iniciar el folding, se realizó una cromatografía utilizando una columna Hi Trap desalting conectada a un cromatógrafo líquido ÄKTA Purifier System (GE Healthcare). El equilibrado fue realizado usando Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. La proteína fue eluída con el buffer de equilibrado en 1,2 ml e incubada a temperatura ambiente en ausencia (control negativo) y presencia de agentes redox: 2-mercaptoetanol 0,25 mM (control positivo), GSSG (glutación oxidado) 0,5 mM, o GSSG 0,5 mM / GSH (glutación reducido) 1 mM. Para monitorear el folding, se retiraron alícuotas a distintos tiempos (2 min, 30 min, y 5 h en el caso de las condiciones GSH y GSSG/GSH; 30 min, 5h y 24 h en el caso de los controles positivo y negativo) y las reacciones fueron detenidas mediante el agregado de TFA hasta una concentración final de 0,7%. Cada alícuota fue analizada mediante RP-HPLC.

### **M.18 RP HPLC**

Se empleó este tipo de cromatografía para purificar las proteínas StcCl y 5N-StcCl empleadas para realizar los ensayos de plegado o folding oxidativo y

para analizar el plegado de las proteínas observando las diferentes formas presentes. Las muestras fueron analizadas por RP-HPLC en un equipo Waters Alliance usando una columna Nova-Pak C8 4  $\mu$ m 3,9x150 mm (Waters) y un gradiente lineal de 2-60% de acetonitrilo con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA; Sigma) a un flujo de 0,75 ml/min durante 40 min. En el caso de la purificación, la identidad de la proteína fue determinada mediante MALDI TOF MS en un espectrómetro de masas Bruker ultrafleX-treme. La concentración proteica fue determinada mediante la medida de la absorbancia a 280 nm considerando el coeficiente de absorción teórico de StcCl:  $E_{0,1\%}$  de 1,965 y de 5N-StcCl:  $E_{0,1\%}$  de 1,85.

## M.19 Bioinformática

Los modelos estructurales de los inhibidores o potenciales inhibidores a estudiar, se construyeron utilizando el programa para modelado por homología, MODELLER (Sali&Blundell 1993). Las estructuras usadas como modelo fueron:

- Estructura de RMN de un péptido de tomate (código PDB: 2HLG).
- Estructura cristalográfica del complejo entre carboxipeptidasa A y el inhibidor de papa (código PDB: 4CPA).

Para realizar el modelado se dio entrada en el MODELLER a tres archivos que contienen la siguiente información: Archivo que contiene las coordenadas de los átomos de la estructura a usar como molde o plantilla (archivo PDB), archivo de alineamiento entre la estructura molde y la secuencia a ser modelada, y los comandos del MODELLER en un archivo que instruye al programa lo que debe hacer (*script*).

La calidad de los modelos obtenidos se evaluó en el servidor PDB Sum (Laskowski 2001) utilizando Procheck (Laskowski 1993).

Por medio del método llamado Docking (Lengauer 1996), el cual predice la orientación de preferencia de una molécula para interactuar con una segunda formando entre ellas un complejo estable, se estudiaron las interacciones entre los modelos construidos y CPA.

El servidor que se utilizó para este método fue CLUSPRO (*protein-protein docking*) (Padhorny 2016), el cual predice la interacción proteína-proteína.

Para estudiar los modelos y sus interacciones se hizo uso del programa Quimera (Pettersen 2004). Desde este programa también se obtuvieron las imágenes mostradas en el apartado de modelado.





# Capítulo 1

---

Screening, purificación y  
caracterización bioquímica y  
proteómica de inhibidores de  
proteasas



# CAPÍTULO 1: SCREENING, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PROTEÓMICA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

## 1.1 Obtención del Extracto Crudo y purificación preliminar

Para realizar este trabajo se utilizaron tubérculos de papas *Solanum tuberosum* grupo andigenum. Estas especies son llamadas vulgarmente “papas andinas” y fueron provistas por una Cooperativa Agropecuaria y Artesanal, Unión Quebrada y Valles, llamada CAUQUEVA ([www.cauqueva.org.ar](http://www.cauqueva.org.ar)) la cual se encuentra en Maimará, provincia de Jujuy, Argentina.



**Figura 1.1:** Papas andinas, *Solanum tuberosum* grupo andigenum

A partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad Churqueña se obtuvieron una serie de Extractos Crudos (ECs) mediante el procesado en frío de las papas sin piel en diferentes buffers o soluciones de extracción: Tris-HCl 0,1 M pH 7,2; Tris-HCl 0,1 M de pH 7,2 en presencia de ácido ascórbico (relación de 4 gr por Kg de papa); solución de DTT 1mM y agua destilada. El EC más adecuado resultó ser el que se obtuvo utilizando agua destilada fría para la extracción y una serie de centrifugaciones, finalizando con una filtración a través de filtro de 0,2  $\mu$ m. Este extractivo

mantuvo la homogeneidad y la transparencia luego de ser congelado y descongelado varias veces, proceso requerido para usar las muestras en estado líquido en los distintos procesos de purificación y caracterización. Además de la transparencia del extracto, el hecho de no poseer sales, evitó interferencias en las distintas determinaciones experimentales tales como medidas espectrofotométricas, SDS-PAGE, IEF, técnicas proteómicas, etc. La concentración de proteínas estimada a través del método de Bradford de este EC elegido para continuar con los ensayos posteriores de caracterización fue de 790 µg/ml.

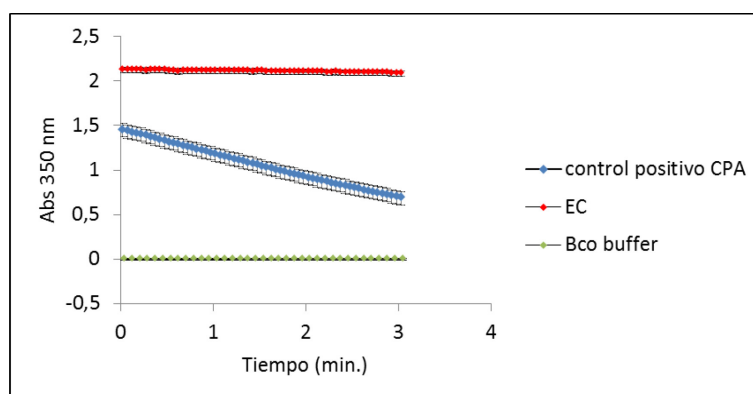
Los demás extractos fueron descartados por aumento de turbidez y pardeamiento que sufrieron a medida que se congelaron y descongelaron las muestras. Por otra parte, el alto contenido salino de los buffers utilizados para esas preparaciones interfería en los ensayos de determinación de actividad y seguimiento de la purificación, observándose una notoria disminución en la recuperación de actividad biológica.

## **1.2 Screening de inhibidores: actividad inhibitoria de la muestra frente a proteasas de distintos tipos mecanísticos**

Al extracto obtenido se le determinó la actividad inhibitoria de proteasas con diversos mecanismos de reacción, como ser, carboxipeptidasa A (metaloproteasa), papaína (cisteínprotease), subtilisina y tripsina (ambas serinproteasas), con el fin de evaluar ante qué tipo de enzima el EC posee mayor actividad inhibitoria. Dicha actividad inhibitoria se manifiesta a través de la disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato, la cual puede ser determinada espectrofotométricamente, según la metodología descrita en el apartado 4 de Materiales y Métodos. En cada caso se realizaron dos tipos de controles negativos. El primero se realizó preincubando el sustrato con el buffer de reacción y el segundo ensayo preincubando la enzima con el mismo buffer. Esto permitió corroborar que el sustrato y los demás reactivos son estables durante la preincubación.

### 1.2.1 Inhibición de carboxipeptidasa A (CPA)

La actividad de carboxipeptidasa (metalo-carboxipeptidasa) se manifiesta por la desaparición del color naranja que posee el sustrato N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, el cual es detectado por la medición de absorbancia a una longitud de onda de 350 nm, y que se corresponde con la hidrólisis del sustrato. Al incorporar el extractivo se determinó la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa, la cual se manifiesta por **una disminución en la velocidad** de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción (correspondiente a una disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato).



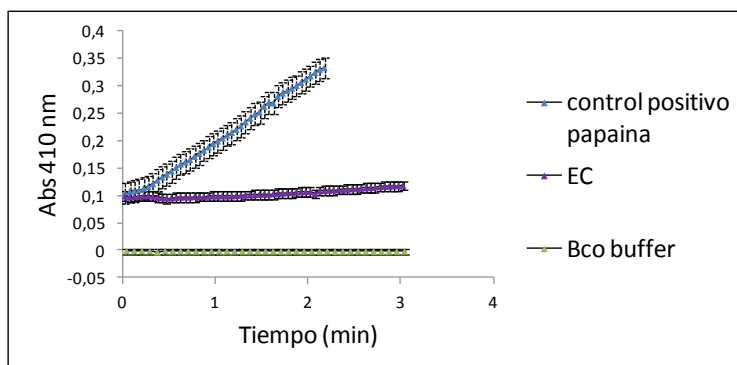
**Figura 1.2:** Determinación de la actividad inhibitoria de CPA. Medición espectrofotométrica de la desaparición del sustrato AAFP a través del tiempo. Control positivo CPA: buffer de reacción + CPA + sustrato; EC: buffer de reacción + CPA + sustrato + Extracto Crudo; Bco buffer: buffer de reacción.

En la Figura 1.2 se observa que la actividad de la enzima carboxipeptidasa A disminuyó instantáneamente en presencia de 200  $\mu$ L de EC.

### 1.2.2 Inhibición de papaína

La actividad hidrolítica de papaína (proteasa cisteínica) fue registrada por el aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37°C. Este aumento en la

absorbancia se manifestó debido a la hidrólisis del sustrato específico PFLNA, ya que uno de los productos de esta reacción es el paranitrofenol (PNF) el cual es el responsable del incremento del color amarillo a medida que se produce la reacción de hidrólisis. Ante la incorporación de extracto a la mezcla de reacción, la falta de aumento en la absorbancia durante el tiempo de reacción es indicativa de la presencia de la actividad inhibitoria en el extracto.

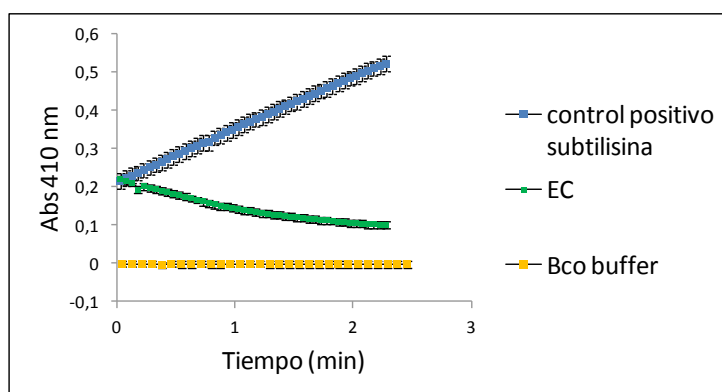


**Figura 1.3:** Determinación de la actividad inhibitoria de papaína. Medición espectrofotométrica de la degradación de PFLNA a través del tiempo. Control positivo papaína: buffer de reacción + papaína + sustrato; EC: buffer de reacción + papaína + sustrato + Extracto Crudo.; Bco. buffer: buffer de reacción

La Figura 1.3 nos muestra la actividad de papaína en presencia y en ausencia del EC. Como puede observarse, la actividad de dicha enzima cae un 90% luego del agregado de 200  $\mu$ l de EC lo cual demuestra que en el extracto existen moléculas que producen la inhibición de papaína.

### 1.2.3 Inhibición de subtilisina

La actividad de esta enzima (proteasa serínica) fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm ya que el compuesto derivado de la hidrólisis del sustrato ZGGLNA es el paranitrofenol (PNF), el cual es el responsable del incremento del color amarillo a medida que se produce la reacción de hidrólisis.

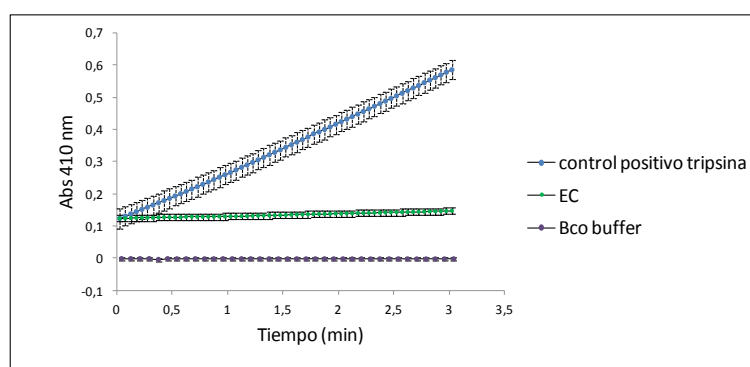


**Figura 1.4:** Determinación de la actividad inhibitoria de subtilisina. Medición espectrofotométrica de la degradación de ZGGLNA a través del tiempo. Control positivo subtilisina: buffer de reacción + subtilisina + sustrato; EC: buffer de reacción + subtilisina + sustrato + Extracto Crudo.; Bco. buffer: buffer de reacción.

Al incorporar 200  $\mu$ l de EC se puede observar que la actividad de subtilisina cae al 100%, lo que indica la existencia en este extracto de al menos un inhibidor de esta proteasa

#### 1.2.4 Inhibición de tripsina

La actividad de tripsina (proteasa serínica) fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm debido a la hidrólisis del sustrato BAPNA, mediante medidas continuas durante 180 seg a 37°C.

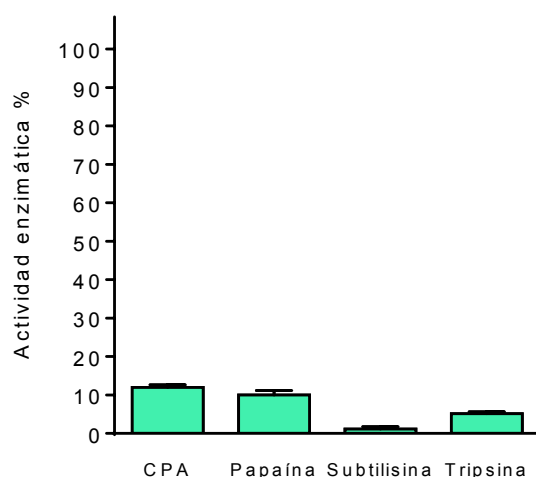


**Figura 1.5:** Determinación de la actividad inhibitoria de tripsina. Medición espectrofotométrica de la degradación de BAPNA a través del tiempo. Control positivo tripsina: buffer de reacción + tripsina + sustrato; EC: buffer de reacción + tripsina + sustrato + Extracto Crudo.; Bco. buffer: buffer de reacción.

Aquí se puede observar que la actividad enzimática de tripsina disminuye un 95%. Al igual que en los casos anteriores, la inhibición de la enzima es notable, lo cual también representa un interesante resultado para la búsqueda de moléculas inhibidoras específicas de esta enzima.

### 1.3 Resumen del “screening” de la evaluación de las actividades inhibitorias del EC de churqueña frente a proteasas de distinto tipo mecanístico

Con los resultados obtenidos, podemos decir que el EC de Churqueña presenta una intensa actividad inhibitoria al ser expuesto frente a proteasas como carboxipeptidasa A, papaína, subtilisina y tripsina, lo cual puede observarse en la Figura 1.6.



**Figura 1.6:** Actividad enzimática residual porcentual.

La inhibición observada en las distintas enzimas, en principio, podría indicar que nos encontramos en presencia de moléculas inhibidoras específicas para cada tipo de proteasa. A la hora de la elección del tipo de inhibidor a estudiar en mayor profundidad, no solamente se tuvieron en cuenta las destacadas actividades inhibitorias observadas, sino también la disponibilidad de enzima control, de enzima inmovilizada y sustratos cromogénicos para seguimiento, así como la factibilidad de obtención de resultados positivos



amparados en datos bibliográficos, como ser información de genes en bases de datos para el diseño de cebadores específicos para clonación, entre otras informaciones.

Cabe señalar que uno de los factores más influyentes en la elección del inhibidor a estudiar fue la inmovilización de proteasas en glioxil-agarosa (ver metodología sección M.8 en Materiales y métodos). La inmovilización es una parte crucial de este trabajo, sobre todo en la parte inicial de purificación de los inhibidores de proteasas y para identificación en una de las técnicas proteómicas utilizadas.

Las tres proteasas comerciales inmovilizadas fueron: tripsina, papaína y CPA. Los rendimientos de inmovilización arrojaron una recuperación de más del 90% de mantenimiento de la actividad biológica de las proteasas inmovilizadas. La estabilidad enzimática fue apreciable durante su conservación a 4° C, y recuperación total de la actividad luego de cada etapa de almacenamiento. Cabe recordar que la inmovilización en glioxil agarosa es una inmovilización covalente entre el soporte y la enzima, por lo que la enzima puede ser reutilizable en varios procesos. La reutilización de la enzima fue evaluada semanalmente verificando la conservación de su actividad biológica manteniendo en cada período las mismas condiciones de ensayo así como también su estabilidad a pHs entre 2 y 10.

Se realizaron cromatografías de afinidad sobre tripsina agarosa, papaína agarosa y CPA agarosa utilizando EC de Churqueña como fuente de inhibidores. A pesar del buen funcionamiento en todos los casos, se observó una mayor recuperación de la actividad inhibitoria en las cromatografías de tripsina y de CPA (datos no mostrados).

Estos resultados permitieron saber que disponíamos de dos buenas matrices de afinidad para el seguimiento y estudio de dos tipos de inhibidores de proteasas.

Una vez evaluada la disponibilidad, recuperación, reutilización y funcionalidad de las proteasas y de saber de cuales podemos disponer para todo el estudio, la decisión del inhibidor a investigar pasó por los demás factores a tener en cuenta que fueron nombrados anteriormente (disponibilidad

de enzima control y sustratos cromogénicos para seguimiento y posibilidad de aplicación biológica, entre otras)

Por lo que, en base a estos argumentos y verificaciones, se decidió aislar, purificar, caracterizar, clonar y expresar nuevos inhibidores de carboxipeptidasas de papa andina.

#### **1.4 Aislamiento y caracterización de inhibidores de carboxipeptidasa A**

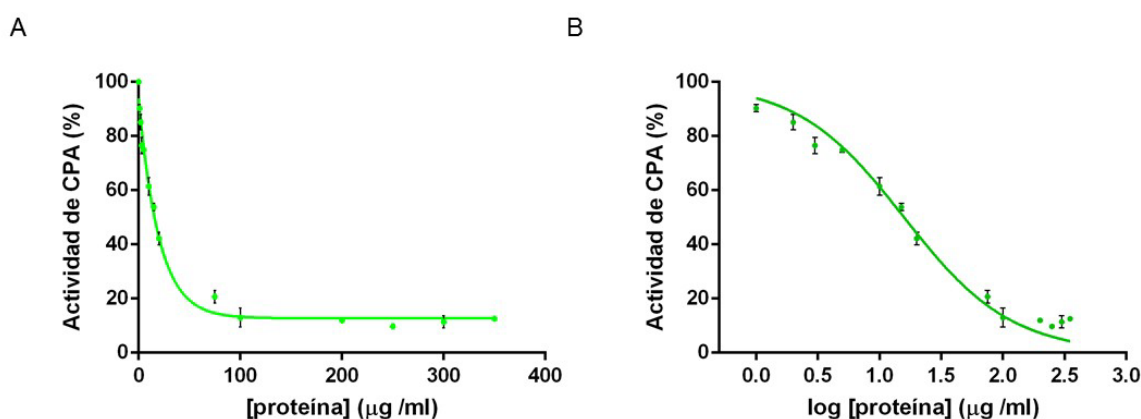
A partir de lo expuesto anteriormente nuestros esfuerzos se centraron en la purificación y caracterización de inhibidores correspondientes a la enzima carboxipeptidasa A.

##### **1.4.1 Curva dosis-respuesta del Extracto Crudo frente a CPA**

La forma de representar la variación de la actividad enzimática en función de la concentración de un inhibidor, o extracto en este caso, se denomina curva dosis-respuesta (aunque el término dosis se encuentre correctamente aplicado a ensayos *in vivo*). Para cualquier inhibidor que se une reversiblemente a un solo sitio de una molécula de enzima (Interacción estequiométrica 1 a 1), se espera que la interacción, y por lo tanto la inhibición, sean saturables. Entonces, si la variación de la actividad enzimática es representada como  $v_i/v_0$  ( $v_i$  como la velocidad de la enzima libre en presencia de EC;  $v_0$  como la velocidad de la enzima libre en ausencia de EC) de forma porcentual, en función de la concentración de EC; se obtiene una figura como la 1.7 A y si se representan los datos en forma semilogarítmica se obtiene la figura 1.7 B. Como se puede ver en la escala semilogarítmica la velocidad enzimática es una función sigmoidea de la concentración de EC, mostrando un valor de “plateau” hacia el 100% a bajas concentraciones de EC y un segundo “plateau” hacia 0% en presencia de altas concentraciones de EC, mostrando un comportamiento típico de inhibidores de proteasas. El punto medio de esta función sigmoidea se encuentra a un valor de velocidad del 50% correspondiendo al 50% de inhibición de la enzima ensayada. El valor IC<sub>50</sub> define la concentración requerida para saturar la mitad de la enzima presente

bajo condiciones específicas de ensayo y es comúnmente usado como una medida relativa de la potencia del inhibidor o EC. De esta manera los valores de IC<sub>50</sub> son típicamente usados para clasificar los inhibidores mediante su potencia.

Sin embargo, cambios en condiciones de la solución de ensayo, tal como pH, fuerza iónica y temperatura, pueden perturbar significativamente la medida del valor de IC<sub>50</sub>. Por lo tanto, estas condiciones deben mantenerse constantes cuando se comparan datos de diferentes inhibidores. En este contexto, el factor más importante que influye en el valor de IC<sub>50</sub> es la concentración de sustrato usada para inhibidores de diferente modalidad (Copeland 2005).



**Figura 1.7:** Curvas dosis-respuesta del EC en escala lineal (A) y logarítmica (B).

Para obtener el valor de IC<sub>50</sub> se utilizó el ajuste de una curva generada en el programa Graph Pad, y el valor obtenido fue de 15,73 µg. de proteína/ml medio reacción.

#### 1.4.2 Efecto de tratamientos térmicos

Teniendo en cuenta que el inhibidor de CPA es un péptido termorresistente, el EC fue sometido a tratamientos térmicos de 60°C, 70°C, 85°C y 100°C durante 60 min., en cada caso. Luego se procedió a centrifugar cada muestra a una velocidad de 11000 xg durante 90 min a 4°C. Se recibió el

sobrenadante en tubos eppendorf y se continuó con el ensayo de determinación de la concentración proteica.

A cada una de las muestras se le estimó mediante el reactivo de Bradford la concentración proteica. Se puede observar de esta manera el efecto que el calor ejerce sobre las proteínas solubles contenidas en la muestra (Tabla 1).

**Tabla 1.1: Concentración proteica luego de cada tratamiento térmico.**

| Muestra | Concentración proteica (µg/ml) |
|---------|--------------------------------|
| EC      | 789                            |
| TT 60   | 112                            |
| TT 70   | 88                             |
| TT 85   | 92                             |
| TT 100  | 82                             |

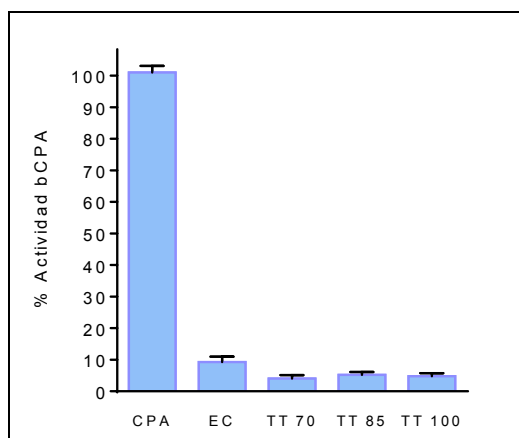
EC: Extracto Crudo; TT60: Tratamiento Térmico a 60°C; TT70: Tratamiento Térmico a 70°C; TT85: Tratamiento Térmico a 85°C; TT100: Tratamiento Térmico a 100°C.

Como puede apreciarse, la gran pérdida de proteínas que se obtuvo se debe a la desnaturalización térmica de las mismas. Se destaca que los tratamientos a 70°C, 85°C y 100°C prácticamente no presentan diferencias en la concentración final de proteínas obtenidas. Sin embargo, mediante este ensayo no se puede determinar si las proteínas solubles mantienen su actividad. Para el caso de inhibidores de proteasas, el paso siguiente consistió en evaluar la actividad inhibitoria residual.

#### **1.4.2.1 Actividad inhibitoria de CPA frente a los diferentes tratamientos térmicos.**

En el siguiente ensayo se evaluó la estabilidad térmica que los inhibidores de carboxipeptidasa se sabe que poseen (Bártová V. 2008), incluso

incubándolos a una temperatura de 100°C. De esta manera a cada tratamiento térmico se le determinó la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.

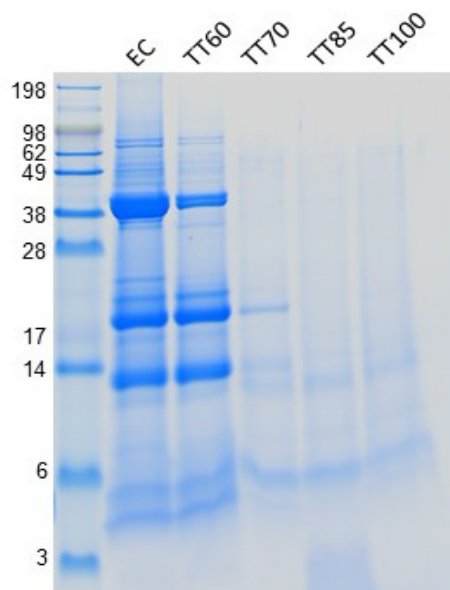


**Figura 1.8:** Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A en presencia del EC luego del tratamiento a distintas temperaturas.

Se observa que la actividad inhibitoria de CPA se conserva con los diferentes tratamientos térmicos, a pesar de la gran pérdida de proteínas que se obtuvo debido a la desnaturalización de las mismas. Por lo tanto, se puede observar que el tratamiento térmico afecta a las demás proteínas que constituyen el EC excepto a los inhibidores, generando un tratamiento preliminar de muy alto rendimiento de purificación.

#### **1.4.2.2 Perfil electroforético del EC y los tratamientos térmicos de Churqueña**

La Figura 1.9 muestra la distribución de masas moleculares de las proteínas constituyentes del EC y de los tratamientos térmicos a 60, 70, 85 y 100°C. En el EC se observan bandas intensas de alrededor de 40 kDa, 20 kDa, 13 kDa y menores de 6 kDa. Mientras que en los tratamientos térmicos las bandas de mayor peso molecular se pierden, las bandas de menor peso molecular se mantienen aún en el tratamiento a 100°C.

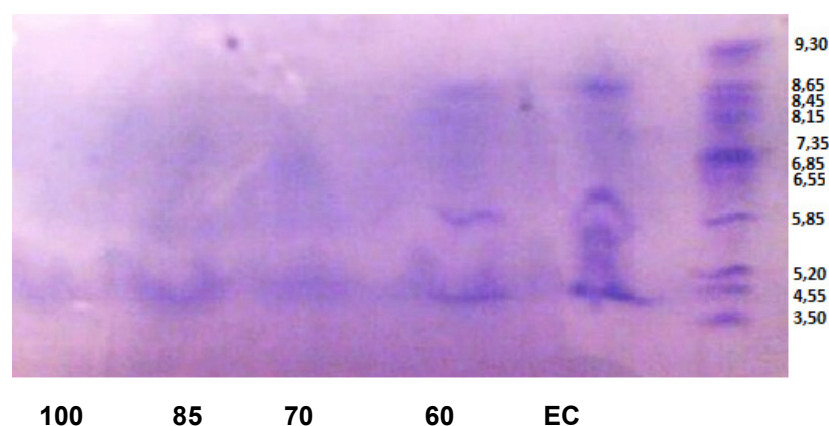


**Figura 1.9:** Electroforesis SDS-PAGE del EC y de los tratamientos termicos, TT100: EC tratado a 100 °C; TT85: EC tratado a 85 °C; TT70: EC tratado a 70 °C; TT60: EC tratado a 60 °C, EC: Extracto Crudo.

Entre las bandas menores a 6 kDa sería posible que se encuentren los inhibidores de CPA ya que ha sido demostrado (Bartová, 2008) que los inhibidores de proteasas de bajo peso molecular son estables a altas temperaturas y además los extractos tratados térmicamente mantienen la actividad inhibidora de carboxipeptidasa A.

#### 1.4.2.3 Estimación del punto isoelectrico

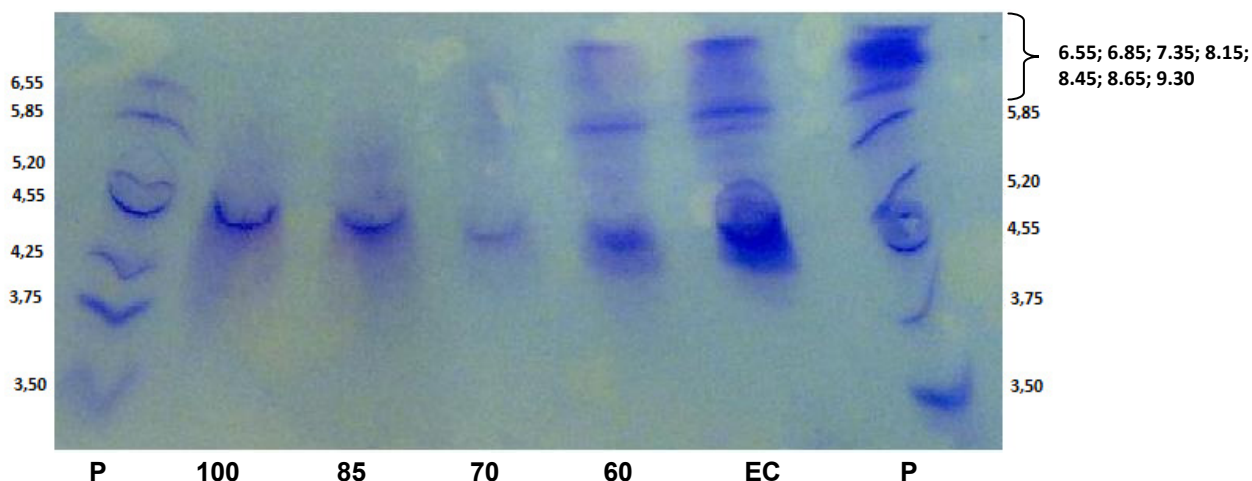
Para estimar el punto isoelectrico de las proteínas contenidas en el EC y los tratamientos térmicos, se realizó un isoelectroenfoque empleando en el gel de desarrollo anfolitos de pI de 3 a 10 (apartado 10 de M&M). Se usaron patrones de pI de amplio rango (3,5-9,3)



**Figura 1.10:** Isoelectroenfoque (con anfolitos de pl de 3 a 10) del EC y los tratamientos térmicos a 100°C (100), 85°C (85), 70°C (70) y 60°C (60).

Como se puede observar en la Figura 1.10 las proteínas de interés que se encontrarían en los tratamientos térmicos de 100°C enfocan a pls ácidos, por lo que decidimos realizar otro ensayo de IEF utilizando anfolitos en el rango ácido de pl. Por otro lado, se puede notar que las muestras no se observan en forma nítida, por lo que las muestras fueron concentradas mediante liofilización con el objetivo de poder visualizarlas de manera más clara.

En base a los resultados obtenidos se realizó un nuevo IEF con anfolitos de pl de 3 a 7.



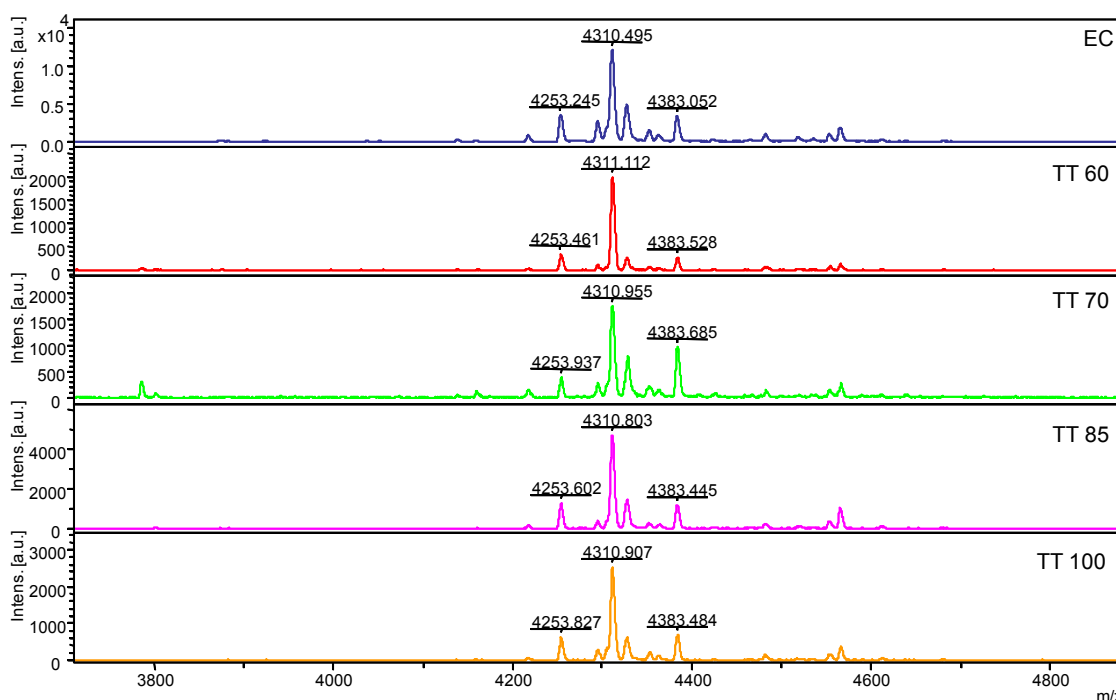
**Figura 1.11:** Isoelectroenfoque (con anfolitos de pl de 3 a 7) del EC y de los tratamientos térmicos a 100°C (100), 85°C (85), 70°C (70) y 60°C (60). Arriba a la derecha se observan los patrones de pl apilados entre los pl de 6,55 a 9,30 (P).

En la Figura 1.11, en las muestras correspondientes a los tratamientos térmicos de 70, 85 y 100°C, pueden visualizarse proteínas que enfocan en su

mayoría en pls de alrededor de 4,5. A su vez, podemos apreciar en este ensayo, al igual que en el SDS-PAGE, la pérdida de proteínas presentes en el EC con cada tratamiento térmico.

#### 1.4.2.4 Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS del EC y las muestras tratadas térmicamente

El objetivo de este análisis fue la caracterización de los tratamientos térmicos mediante la aplicación de una técnica versátil de alta resolución tal como lo es la espectrometría de masas con el fin de determinar la presencia de moléculas que podrían ser inhibidores de carboxipeptidasa A.



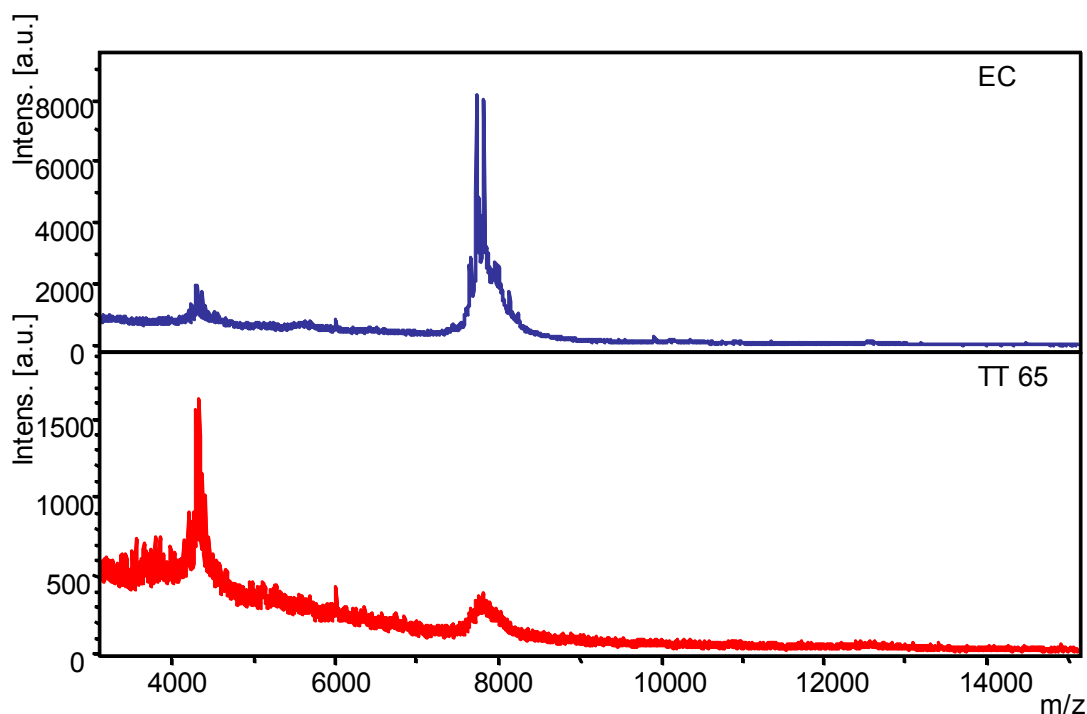
**Figura 1.12:** Espectros de masas del EC y tratamiento térmicos a 60°C (TT 60), 70°C (TT 70), 85°C (TT 85) y 100°C (TT 100), en el rango de peso molecular que va desde 3750 hasta 4850 Da.

Como se puede apreciar en la Figura 1.12, en este rango de peso molecular (3750-4850 Da) no se observan prácticamente diferencias entre las proteínas que existen en el EC y en los tratamientos térmicos; por lo tanto, podemos decir que las moléculas de este rango de peso molecular, entre las



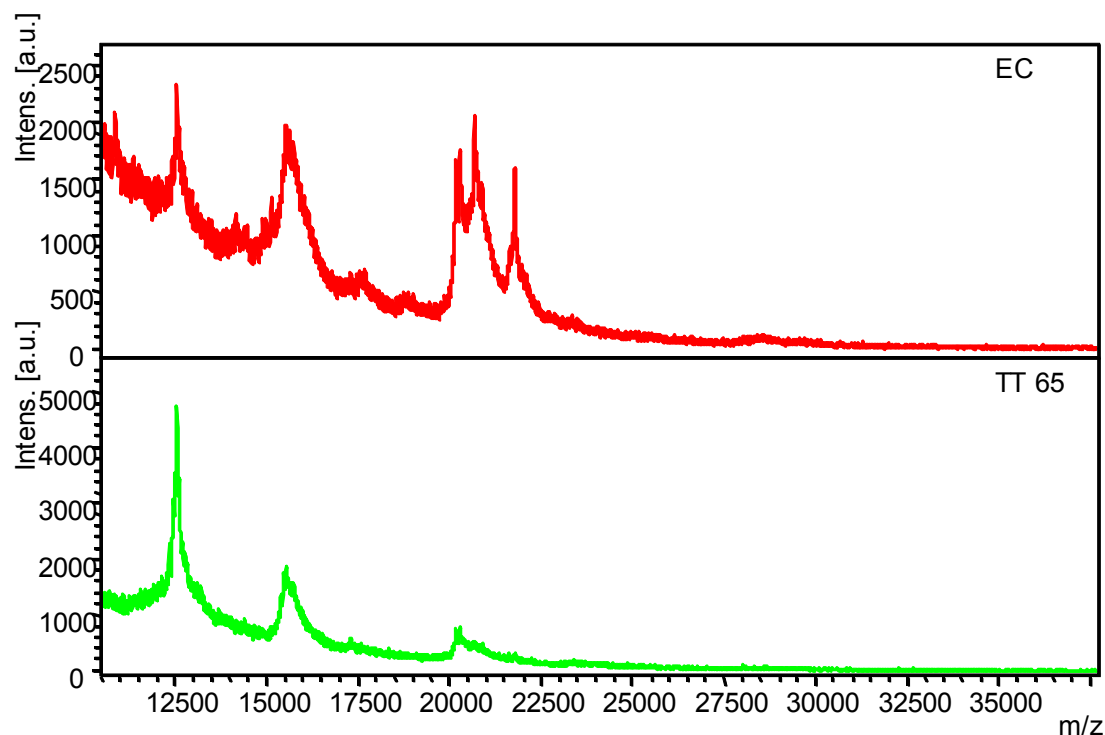
cuales se podría hallar el inhibidor de interés, son estables a los tratamientos con calor. Este dato es muy importante ya que en este rango de pesos moleculares han sido estudiados distintos inhibidores de carboxipeptidasas (Hass, 1981; Lufrano, 2015). A su vez encontramos al tratamiento térmico como una herramienta sencilla, para la purificación de estas moléculas a partir de extractos complejos.

Por otro lado, se decidió realizar un tratamiento térmico a 65°C ya que, en el SDS-PAGE pudimos observar que la mayor disminución del contenido proteico se produce entre 60 y 70°C. El objetivo fue observar el comportamiento de los demás componentes proteicos en este punto de inflexión. Para ello las muestras tratadas fueron analizadas mediante espectrometría de masas y se obtuvo el siguiente resultado.



**Figura 1.13:** Espectros de masas del EC y tratamiento térmico a 65°C (TT 65) en el rango de peso molecular de 3900 a 15000 Da.

La Figura 1.13 muestra el espectro de masas del perfil de proteínas adquirido en un rango entre 4000 Da y 15000 Da. Se puede observar que el tratamiento de 65°C del EC produjo una disminución relativa de la población de proteínas de 8000 Da respecto de las de alrededor de 4000 Da.



**Figura 1.14:** Espectros de masas del EC y tratamiento térmico a 65°C (TT 65) en el rango de peso molecular de 10000 a 35000 Da.

El espectro de masas de la Figura 1.14 muestra el perfil proteico antes y después del tratamiento térmico a 65°C en el rango de peso molecular de 12000 a 35000 Da. Se puede observar que el tratamiento térmico afecta a las proteínas de mayor peso molecular y como consecuencia se observa un enriquecimiento relativo de proteínas de menor peso molecular.

En resumen, el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó en un rango de pesos moleculares de entre 3700 Da y 35000 Da. Para ello se utilizaron tres métodos de adquisición de señales, los cuales se caracterizan por obtener mejores señales a distintos rangos de pesos moleculares. El primer método usado fue en el rango de 3700 a 4900 Da (Figura 1.12) y es donde observamos el inhibidor de interés. El segundo rango utilizado fue desde 3900 hasta 15000 Da, donde se destacan picos de 4000 Da y 7500 (Figura 1.13) Da aproximadamente. El último rango usado abarcó desde los 10000 Da hasta los 35000 Da en el cual se destacan picos de 12000, 15000 y 21000 Da aproximadamente, como muestra la Figura 1.14. De hecho, se utilizó un cuarto método de adquisición de señales, que cubrió desde los 20000

Da hasta los 100000 Da., pero en este caso no fue posible encontrar señal en el espectro. Esto se debe a que las proteínas más grandes y pesadas son difíciles de ver en un MALDI-TOF MS debido a su dificultad para ionizarse y posteriormente volar ("time of flight") hacia el detector de señales, lo cual no implica que las proteínas no se encuentren en la muestra.

Por este motivo la combinación de la electroforesis junto con la espectrometría de masas nos posibilita de una herramienta de control y seguimiento de composición de muestras proteicas, acoplando la buena señal y sensibilidad que nos da el espectrómetro de masas a bajos pesos moleculares junto a la que nos brinda el SDS PAGE con las proteínas de mayor tamaño molecular.

Como conclusión se puede decir que los tratamientos térmicos en general afectan a las proteínas de mayor tamaño, pero no afectan a gran medida a las de menor tamaño molecular.

### **1.5 Diseño de matrices empleadas para el desarrollo de cromatografía de afinidad**

En esta etapa del trabajo, fue confeccionada la matriz por medio de la cual pudimos aislar las proteínas deseadas (inhibidores) del EC inicial.

Se inmovilizó la enzima CPA en el soporte glioxil-agarosa, y luego se comprobó la estabilidad de la misma. Para verificar que la enzima inmovilizada mantiene su función correctamente, se realizó un seguimiento de actividad enzimática mediante espectrofotometría, similar al descrito en M&M para la enzima libre. En este caso, debió adicionarse al método un agitador magnético para mantener la enzima inmovilizada en suspensión, facilitándose de esta manera el acceso del sustrato a la enzima y la salida del producto para su lectura espectral (Suau T. 2009).

Los resultados obtenidos indicaron que la enzima inmovilizada mantuvo la actividad inicial en un 95% respecto de la enzima libre. Por lo tanto, se puede decir que, la unión covalente entre la enzima y el soporte no afecta la cinética, y la difusión no es un factor limitante en la reacción.

Para determinar la estabilidad térmica de la proteína, el inmovilizado se incubó a 37°C, 45°C y 55°C durante una hora. Finalizado el período de

incubación, se midió la actividad enzimática como se mencionó anteriormente. La enzima inmovilizada mantuvo en todos los casos la misma actividad residual, por lo que el inmovilizado no se ve afectado por tratamientos térmicos en este rango de temperaturas.

Por último, se verificó si el EC inhibe a la CPA inmovilizada. Para ello se puso en contacto el EC y el inmovilizado, y se determinó la actividad residual de la CPA inmovilizada tal como se describió anteriormente. A su vez se realizaron ensayos para verificar que el inhibidor actúa sobre la enzima inmovilizada. Para dichos ensayos se utilizó PCI recombinante (producido y purificado a partir de su expresión heteróloga en *E. coli*) y se determinó la actividad enzimática residual. En ambos casos, tal cual lo suponíamos, la actividad de carboxipeptidasa A cayó prácticamente en un 100% con respecto a la actividad inicial. Con estos resultados, podemos decir que la CPA inmovilizada en glioxil-agarosa puede ser empleada para realizar ensayos de cromatografía y purificar inhibidores (Obregón 2012).

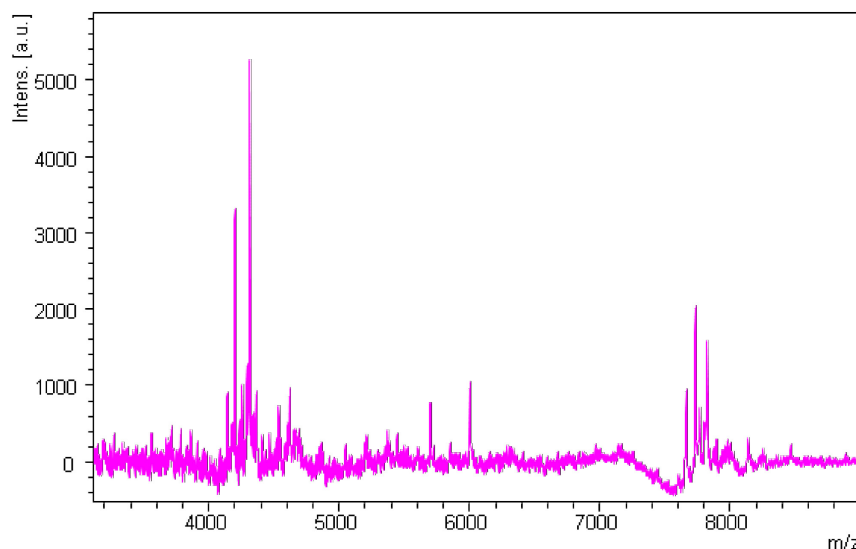
## **1.6 Intensity-fading MALDI-TOF MS**

Mediante el siguiente ensayo fue posible identificar interacciones no covalentes entre CPA y moléculas presentes en el extracto de papa.

En esta técnica el extracto crudo fue sometido a una micro-cromatografía de afinidad (siembra, elución del no retenido, lavados, elución del inhibidor y lavados finales) utilizando CPA inmovilizada, y cada paso de la misma fue analizado por MALDI-TOF MS.

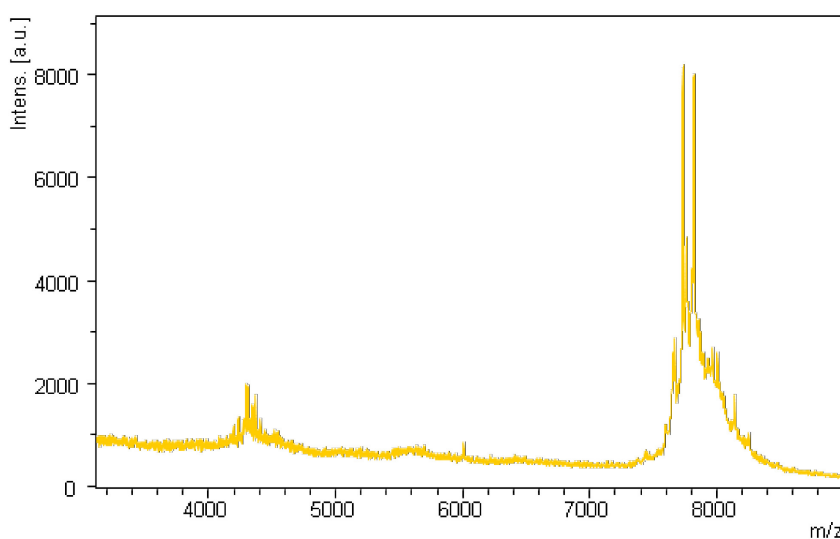
La Figura 1.15 nos muestra el espectro de masas del extracto crudo (sin tratamiento térmico) en el rango de 3000 a 9000 Da, el cual fue utilizado para sembrar en la microcolumna de afinidad. Pueden observarse en el mismo, picos de alrededor de 4000 Da que corresponderían con inhibidores de CPA, tal como se ha descrito anteriormente, y también pueden distinguirse otros constituyentes proteicos cerca de 6000 y 8000 Da. Como ya se mencionó anteriormente la muestra contiene proteínas de alrededor de 8000, 10000, 13500 y 21000 Da las cuales en este caso no son observadas ya que

deseamos realizar un seguimiento de las moléculas de interés de alrededor de 4000 Da.



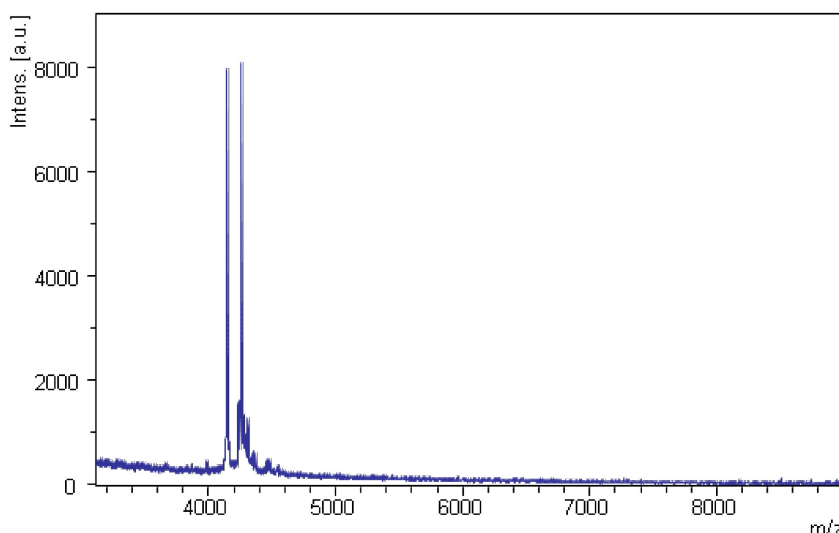
**Figura 1.15:** Espectro de masas del EC de Churqueña.

La Figura 1.16 nos muestra el espectro de masas obtenido luego de la siembra del extracto crudo. Los componentes proteicos observados son los correspondientes a los que eluyen en la fracción no retenida. Se ve una notable disminución relativa del pico de moléculas de alrededor de 4000 Da el cual fue retenido en la columna de afinidad.



**Figura 1.16:** Espectro de masas del No Retenido en el ensayo intensity-fading al EC de Churqueña

En la Figura 1.17 se observa el espectro de masas obtenido luego de la elución final de las moléculas retenidas en la cromatografía de afinidad mediante un cambio de pH (acidificación a pH 5), lo cual modifica la interacción CPA-inhibidor. Se pueden observar claramente dos picos cercanos entre los 4000 y los 5000 Da.



**Figura 1.17:** Espectro de masas de la fracción Retenida en la columna de afinidad en el ensayo intensity-fading al EC de Churqueña

De esta forma, podemos decir que la molécula detectada es un inhibidor de CPA, ya que el mismo interactuó con la enzima inmovilizada y se verificó posteriormente su actividad inhibitoria luego de la elución. A su vez se confirma que el tamaño del inhibidor se encuentra alrededor de los 4300 Da, tanto por la disminución relativa de esta masa en el No Retenido, así como por la masa molecular que apareció en el pico eluído de la cromatografía de afinidad. El hecho de que aparezcan dos picos luego de la elución se puede deber a la presencia de isoinhibidores con pesos moleculares muy parecidos que generalmente no se detectan por electroforesis.

Una vez efectuado este ensayo a baja escala, se procedió a realizar una cromatografía de afinidad a mayor escala. El objetivo del aumento de escala es incrementar la cantidad de inhibidor obtenido para continuar con los ensayos de caracterización.

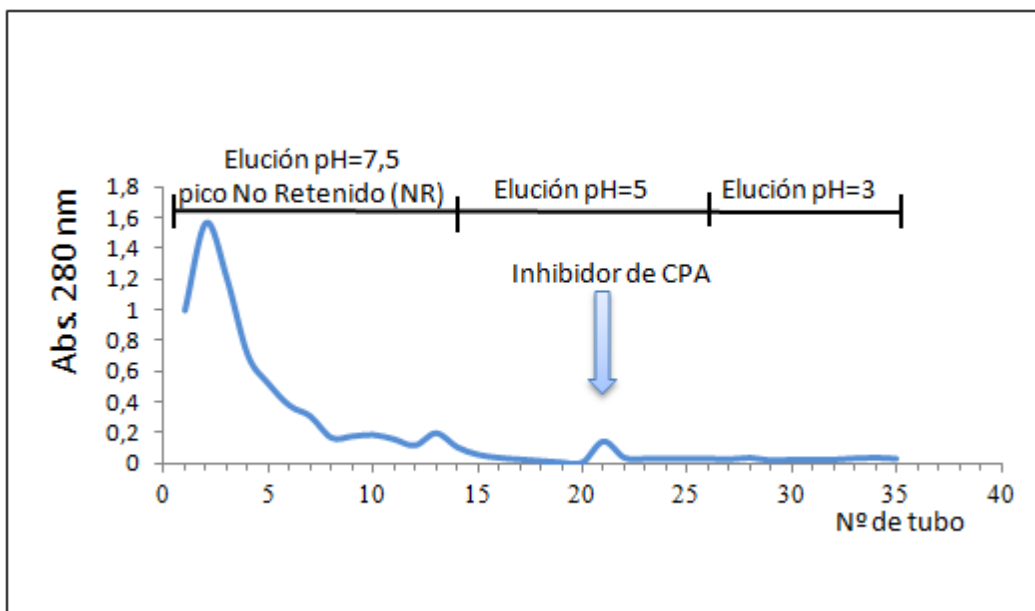
## 1.7 Purificación de inhibidores mediante cromatografía de afinidad

El EC y los tratamientos térmicos (TTs) de 70°C, 85°C y 100°C fueron sometidos a cromatografía de afinidad. Se observó que los TTs permiten la obtención de moléculas más puras cuando son sometidos a cromatografía de afinidad, ya que la muestra de partida es menos compleja y hay menos posibilidad de interacciones inespecíficas con el soporte de glioxil-agarosa.

Como primer ensayo de pruebas se realizó una cromatografía de afinidad CPA-agarosa en batch como control del proceso. Posteriormente el relleno de afinidad fue colocado en una columna para automatizar la purificación.

En la Figura 1.18 se observa uno de los cromatogramas obtenidos por el proceso de purificación, en este caso el de un EC proveniente de Churqueña, sin previo tratamiento térmico, para mostrar la relación entre la fracción no retenida (NR) y la fracción retenida.

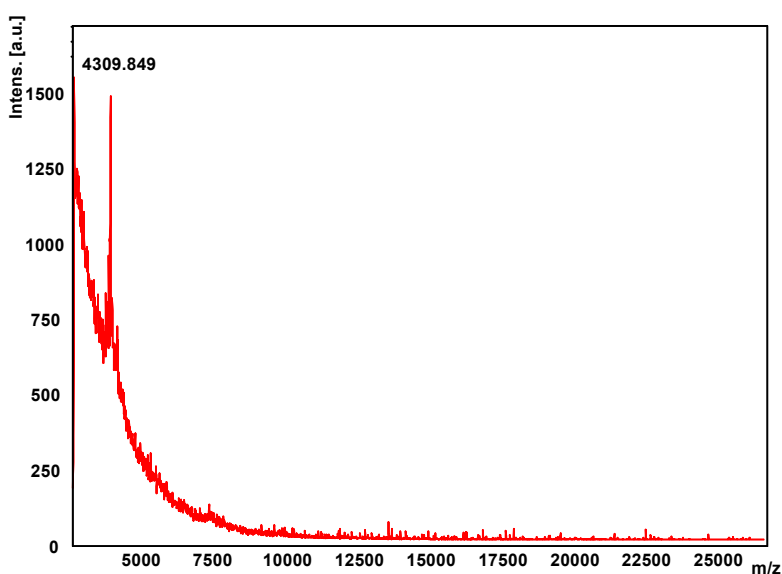
Se pudo observar que el pool del no retenido (NR: Tubos 1-14) no presenta actividad inhibitoria, mientras que hay un pico eluido a pH 5 (tubo 21 y 22) que muestra una fuerte inhibición de CPA (inhibición del 87% con respecto al control positivo).



**Figura 1.18:** Cromatografía de afinidad del EC de Churqueña en CPA-agarosa

### 1.7.1 Determinación del peso molecular del inhibidor obtenido por cromatografía de afinidad

Por espectrometría de masas MALDI-TOF MS se verificó que en el eluyente obtenido a pH 5 existe una molécula inhibidora con una masa molecular de alrededor de 4309,8 Da del orden de las masas de inhibidores de carboxipeptidasa ya estudiados, de 4300 Da (Ryan, 1974), 4234 Da (Lufrano, 2015).

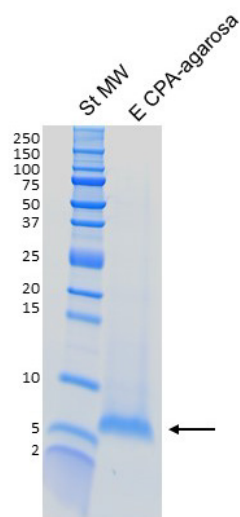


**Figura 1.19:** Espectro de masas de la fracción eluida a pH 5

### 1.7.2 Huella peptídica o PMF (Peptide Mass Fingerprinting)

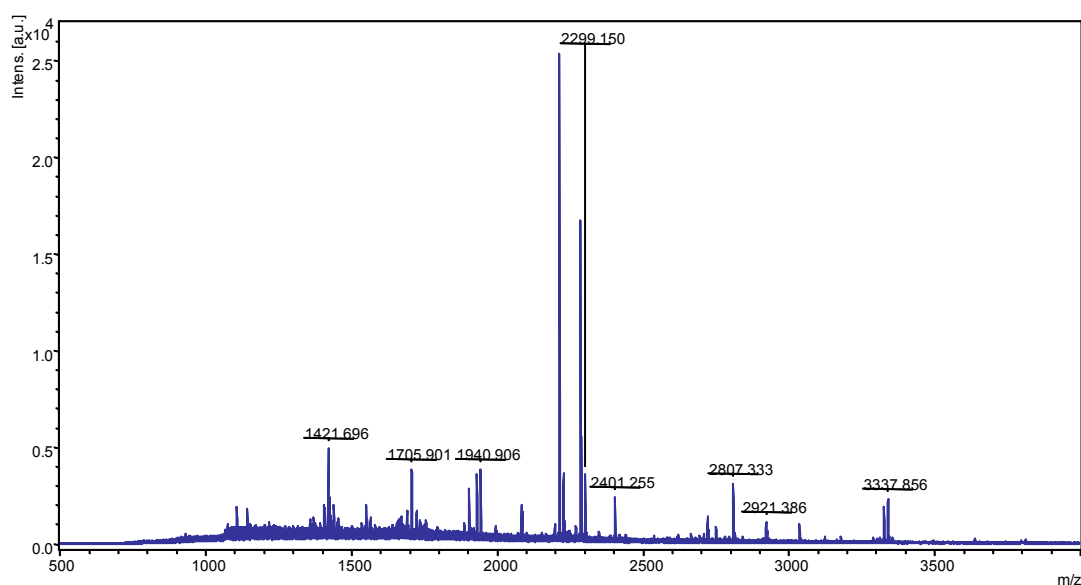
Se realizó una electroforesis SDS-PAGE del eluido a pH 5, obteniéndose una banda de bajo peso molecular. Como puede observarse en la Figura 1.20 esta banda se encuentra por debajo de los 10 kDa, lo cual es compatible con el bajo peso molecular del inhibidor estudiado.





**Figura 1.20:** Electroforesis SDS-PAGE del inhibidor de CPA purificado por cromatografía de afinidad. En el primer carril se observan los patrones de peso molecular en unidades de kDa (St MW). En el segundo, se observa en la fracción eluída a pH5 de la cromatografía de afinidad. La flecha señala la banda correspondiente al inhibidor de CPA presente en el Eluído a pH5 (E CPA-agarosa).

Para realizar un estudio de identificación por espectrometría de masas, la banda fue cortada y sometida a digestión triptica. Luego de la digestión, se procedió a analizar los péptidos generados sembrando los mismos en placa y sometiéndolos a análisis por MALDI-TOF MS. De esta manera, se obtiene una huella peptídica que luego puede ser comparada con bases de datos.



**Figura 1.21:** Huella peptídica del inhibidor de CPA purificado. Espectro de masas MALDI-TOF MS, obtenido luego de la digestión triptica en gel.

El análisis de la huella peptídica utilizando las bases de datos MSDB, Swiss-Prot o NCBI nr, no pudo determinar la identidad del inhibidor encontrado, lo cual confirmaría que se trata de un inhibidor nuevo, no estudiado hasta el momento.

## Capítulo 2

---

**Estudio de potenciales inhibidores  
de carboxipeptidasas de papa.  
Clonado, expresión y actividad.**

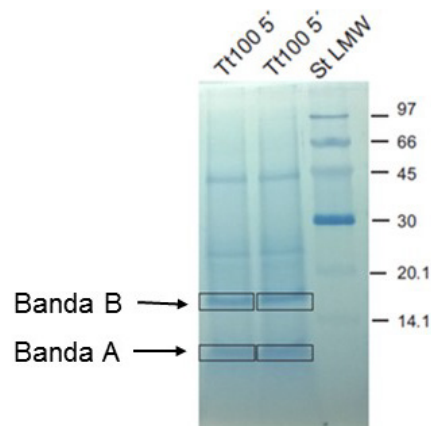


## **CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE POTENCIALES INHIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASAS DE PAPA. CLONADO, EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD.**

Hasta el momento se ha caracterizado un extracto de papas andinas variedad Churqueña con actividad inhibitoria de CPA. Se ha visto además que el componente inhibitorio de ese extracto posee una notable estabilidad térmica. Finalmente se pudo aislar, luego de una cromatografía de afinidad, una fracción retenida que mantiene la estabilidad térmica y conserva la actividad inhibitoria. Luego de caracterizaciones electroforéticas y proteómicas se llega a la conclusión que la molécula inhibitoria no se encuentra aún reportada en bases de datos. Con el fin de esclarecer la identidad de la proteína que produce la inhibición de CPA se continuó la investigación utilizando otras estrategias y técnicas de caracterización y posteriormente se recurrió a la biología molecular con el objetivo de obtener la identidad de esta molécula. La primera estrategia utilizada para tal fin fue un análisis de la secuencia N-terminal por el método de secuenciación de Edman con el fin de esclarecer los primeros aminoácidos que componían su secuencia.

### **2.1 Secuenciación del extremo N-terminal de un inhibidor de carboxipeptidasa A**

Con el fin de secuenciar la región N-terminal de esta nueva molécula, se realizaron varios intentos de transferir la fracción eluida de la cromatografía de afinidad a membranas de PVDF para su posterior secuenciación. A pesar de los múltiples intentos realizados, en ninguno de los casos se obtuvo la cantidad de proteína suficiente para enviar a secuenciar. Para solucionar esta limitación, se realizó una semipurificación mediante tratamiento térmico a 100°C durante 5 minutos, seguida de una concentración de la muestra de 10 veces. Posteriormente, la muestra se sembró en un gel de poliacrilamida al 16%, se realizó una transferencia a una membrana de PVDF, se tiñó con azul de Coomassie y se enviaron a secuenciar las bandas más intensas y de menor peso molecular. En la Figura 2.1 se pueden ver las dos bandas señaladas, con pesos moleculares de alrededor de 15 kDa y menor a 10 kDa respectivamente.



**Figura 2.1:** Membrana de PVDF desde donde se extrajeron las bandas de proteína a secuenciar por degradación de EDMAN. TT100 5': tratamiento térmico a 100°C durante 5' del EC.

La secuenciación se realizó en el Servicio de secuenciación del Lanais-Proem de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y se obtuvieron los siguientes resultados:

Banda A) T X N D Y X X T N X..... (5 pmoles)

D

Banda B) A K A X T L E X G N L... (13 pmoles – 25% de las cadenas sin Ala inicial)

En los resultados adquiridos la X significa que durante la secuenciación no se encontró un aminoácido asignable para esa posición.

Mediante el análisis por BLASTp de estas secuencias se identificaron en las bases de datos de NCBI al menos dos secuencias proteicas de inhibidores de metalocarboxipeptidasas de *Solanum tuberosum* con similitud a la secuencia encontrada para la banda A (Figura 2.2). Por otro lado, se registraron para la banda B secuencias de proinhibidores pero no del tipo de metalocarboxipeptidasas.

|   |
|---|
| <p><b>&gt;NP_001275150.1 - Metalloprotease inhibitor precursor (Nielsen K. L., 2005 sequence described from DQ168310.1)</b></p> <p>MAAKNSEMKFAIFFVLLMTTLVNMQVMALRDMPPQETLLKMKLFSSNVLGTCNDYCN<br/> TNA</p> |
| <p><b>&gt;AIT42218.1 - Metalloprotease inhibitor (Fischer, M., 2015)</b></p> <p>MKFAIFFVLLTTTLVNMSGISKLQVMALRDMPPQETLLKMKLFPSNVLGTCNDYCTT<br/> NA</p>   |

**Figura 2.2:** Inhibidores de metaloproteasas con los cuales obtuvo identificación la banda A secuenciada. En colores se encuentran resaltadas las regiones con las que se obtuvo identificación.

La secuencia NP\_001275150.1 proviene de una secuencia de ARNm (DQ168310.1) enviada por Nielsen en el año 2005 y no hay publicaciones al respecto. En cambio, la secuencia AIT42218.1 fue enviada por Fischer y colaboradores en el año 2014 y existe una publicación asociada al descubrimiento de estas secuencias. En ese artículo (Fischer 2015) se realizó un importante estudio de análisis de 1900 secuencias de ADNc obtenidas de diferentes cultivos de papas (*Solanum tuberosum*), de las cuales 120 fueron identificadas como inhibidores de proteasas en buscadores por homología. De ellas, solo siete se clasificaron como inhibidores putativos de metaloproteasas, sin embargo ninguno de ellos han sido estudiados hasta el momento. En la Figura 2.3 se presentan las secuencias de cada uno de los putativos inhibidores de carboxipeptidasa alineadas con la secuencia de PCI. Para todos los inhibidores las secuencias alineadas se corresponden con sus secuencias proteicas completas, incluyendo el péptido señal, la región pro, el inhibidor maduro y la extensión C-terminal.

Se puede observar que todas las secuencias descubiertas por Fischer poseen un alto porcentaje de similitud (mayor al 90%) entre ellas (Figura 2.3). Además, presentan un 30% de homología con el PCI. Se puede observar en el alineamiento que se encuentran conservadas 5 de las 6 cisteínas presentes en el PCI maduro.

|          |   |
|----------|---|
| PCI      | MGRWIIHIIIFIITMAQKLTLFTILLVVIAAHDNSFYSTKIHVMAQDVVLPTVT----KLF |
| KJ788148 | -----MAAKNSEMKFAlFFVVLTTTLV--NM-----QVMALRDMPPQETLLKMKLF      |
| KJ788149 | -----MAAKNSEMKFAlFFVVLTTTLV--NM-----QVMALRDMPPQETLLKMKLF      |
| KJ788151 | -----MAAKNSEMKFAlFFVVLTTTLV--NM-----QVMALRDMPPQETLLKMKLF      |
| KJ788150 | -----MAAKNSEMKFAlFFVVLTTTLV--NM-----QVMALRDMPPQETLLKMKLF      |
| KJ788145 | -----MTAKNSEMKFAlFFVVLTTTLV--NM-----QVMALRDMPPQETLLKMKLF      |
| KJ788146 | -----MKFAlFFVVLTTTLV--NMSGISKLQVMALRDMPPQETLLKMKLF            |
| KJ788147 | -----MAAKISEMKFAlFFVVLTTTLV--NMSGISKLQVMALRDMPPQETLLKMKLF     |
|          | *::*:*.:.***.. . * :*** : * * ***                             |
| PCI      | QQHADPICNKPCCKTHDDCSGAWFCQAC-WNSARTCGPYVGGAMAIGL              |
| KJ788148 | SSNVLGTNDYCNTNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP--                |
| KJ788149 | SSNVLGTNDYCNTNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP--                |
| KJ788151 | SSNVLGTNDYCNTNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP--                |
| KJ788150 | SSNVLGTNDYCNTNADCLGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP--                |
| KJ788145 | PSNVLGTNDYCTRNDADCFGITLCPWCKLKKSPGGGTYSCESPFP--               |
| KJ788146 | PSNVLGTNDYCTTNADCFGITLCPWCKLKKSPSGGTYSCESPFP--                |
| KJ788147 | PSNVLGTNDYCTTNADCFGITLCPWCKLKKSPSGGTYSCESPFP--                |
|          | .:. **.*. : ** * : * * :. : .*                                |

**Figura 2.3:** Tabla con el alineamiento por homología entre el PCI y las secuencias de ADNc clasificadas como inhibidores putativos de metalocarroboxipeptidasas. En color turquesa se observa el PCI maduro y en rojo se encuentran señlas las cisteínas conservadas en todas las secuencias.

Por otro lado, la base de datos GenBank de NCBI asigna dos formas de inhibidor maduras a las secuencias DQ168310.1 y AIT42218.1 antes mencionadas (Figuras 2.4 y 2.5). Ambos son descritos como inhibidores de carboxipeptidasa A, y el N-terminal asignado por la base de datos para las formas maduras son TCNDYCNTNA (para la secuencia DQ168310.1) y TCNDYCTTNA (para la secuencia AIT42218.1). Ambas secuencias N-terminales son compatibles con la N-terminal que se obtuvo por secuenciación por EDMAN.

FASTA

**metallocarboxypeptidase inhibitor precursor [Solanum tuberosum]**

GenBank: AAZ94178.1

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)

>gb|AAZ94178.1|:52-90 metallocarboxypeptidase inhibitor precursor [Solanum tuberosum]  
TCNDYCNTNADCFGLTLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP

**Figura 2.4:** Forma madura de la proteína DQ168310.1 presentada en la base de datos GenBank



FASTA ▾

**metallocarboxypeptidase inhibitor [Solanum tuberosum]**

GenBank: AIT42218.1

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)

>gb|AIT42218.1|:51-89 metallocarboxypeptidase inhibitor [Solanum tuberosum]  
 TCNDYCTTNADCFGITLCPWCKLKKSPSGGTYSCESPFP

**Figura 2.5:** Forma madura de la proteína AIT42218.1 presentada en la base de datos GenBank

Al calcular el peso molecular teórico de estas dos moléculas (Figura 2.6), y comparándolos con los espectros de masa obtenidos para los tratamientos térmicos del EC de Churqueña y para el ensayo de intensity fading, observamos que las masas moleculares allí obtenidas coinciden o son muy cercanas con la masa de 4311 Da de NP\_001275150.1 (DQ168310.1).

|                                    |                               |             |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------|
| <b>NP_001275150.1 (DQ168310.1)</b> |                               |             |
| <b>TCNDYCNTNAD</b>                 | DCFGLTLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP | PM 4311,875 |
| <b>AIT42218.1</b>                  |                               |             |
| <b>TCNDYCTTNAD</b>                 | CFGITLCPWCKLKKSPSGGTYSCESPFP  | PM 4236,807 |

**Figura 2.6:** Secuencias maduras de las proteínas NP\_001275150.1 (DQ168310.1) y AIT42218.1 con sus respectivos pesos moleculares.

Por todo lo expuesto, consideramos probable que la molécula que se encuentra en el EC de Churqueña y que provoca inhibición de CPA detectada, sea NP\_001275150.1 (DQ168310.1), a partir de ahora denominada StcCI. Por lo tanto, se decidió expresar esta molécula de forma recombinante y comprobar su actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas.

## 2.2 Expresión recombinante de StcCI

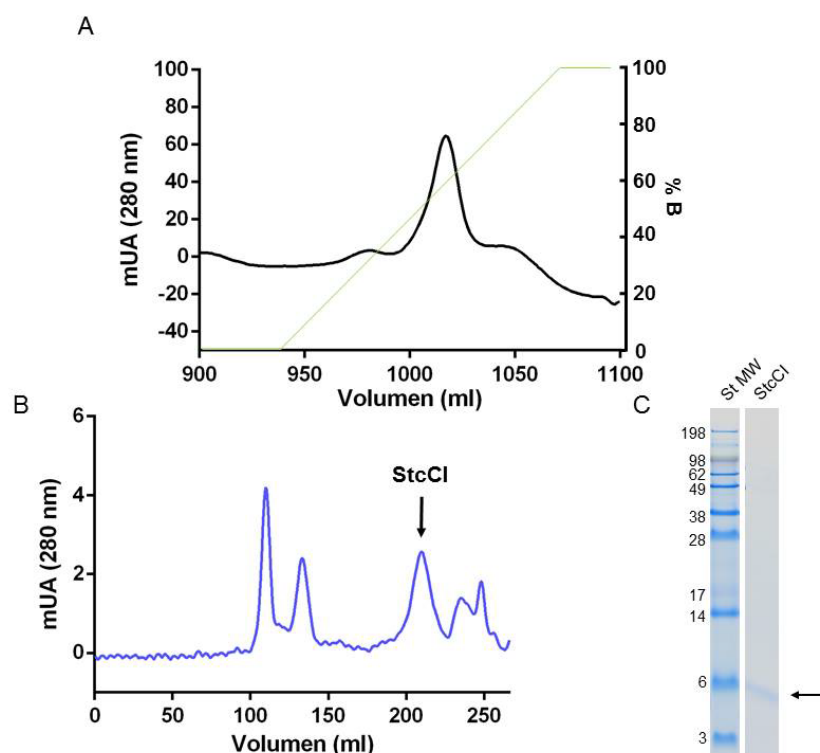
Con el fin de expresar el inhibidor putativo StcCI, se procedió a la generación del constructo de expresión mediante la técnica de PCR recursiva

con la utilización de una serie de primers solapantes. Además de la secuencia del inhibidor se incorporó en esta construcción la secuencia OmpA para la secreción de la proteína al periplasma. La secuencia generada fue luego introducida por medio de clonado por enzimas de restricción en el vector pIN-III OmpA3 y el constructo final fue confirmado por secuenciación.

Luego, se procedió a la expresión del constructo bajo la misma metodología empleada para el PCI Chu en la Parte 2 de esta tesis. Se utilizó para esto un medio mínimo, cuya composición se encuentra en materiales y métodos, y se realizó la inducción de la expresión con IPTG. Luego de veinte horas de expresión a 37°C se separó el medio por centrifugación y el sobrenadante se sometió a condiciones oxido-reductoras óptimas para obtener un correcto plegado del StcCI.

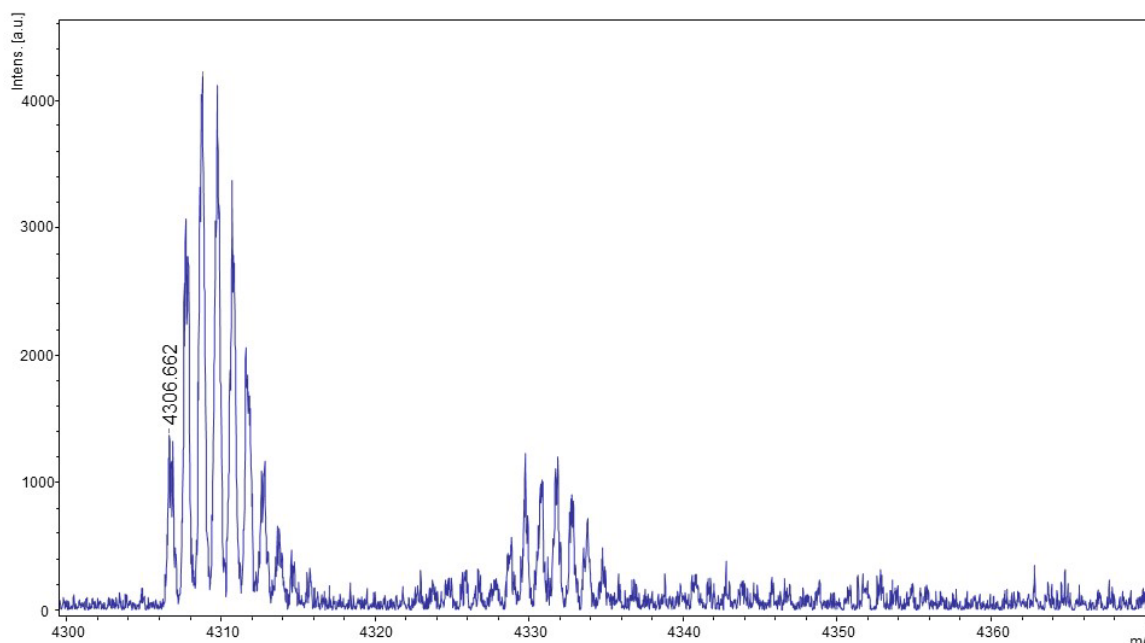
### **2.2.1 Purificación de StcCI**

La purificación de StcCI se realizó mediante una cromatografía de intercambio catiónico, seguida de una cromatografía de exclusión molecular. Como fue explicado para la purificación de PCI Chu, la muestra fue acidificada a pH 3,5 y sembrada en una columna de intercambio catiónico. La elución se realizó con un gradiente de pH hasta 8,5 (Figura 2.7 A) y el pico eluido se analizó mediante espectrometría de masas para corroborar la presencia de la molécula de interés.



**Figura 2.7:** Purificación de StcCl. (A) Cromatograma obtenido en de la purificación mediante intercambio catiónico, %B representa el porcentaje de fosfato de sodio durante la cromatografía. (B) Cromatograma obtenido de la purificación mediante cromatografía de exclusión molecular, se encuentra señalado el pico donde se encuentra el StcCl, identificado mediante MALDI-TOF MS. (C) Gel de tricina donde se observa el patrón de peso molecular, StcCl y sus valores en Da, y la muestra obtenida de la cromatografía de exclusión molecular concentrada, StcCl. Una flecha señala la banda correspondiente a StcCl.

Luego se procedió a hacer una cromatografía de exclusión molecular con el fin de obtener a homogeneidad la molécula expresada (Figura 2.7 B); el eluido de esta columna fue concentrado 20 veces. La presencia y la pureza de la molécula purificada fueron determinadas a través de un gel de tricina (Figura 2.7 C) y mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Figura 2.8).



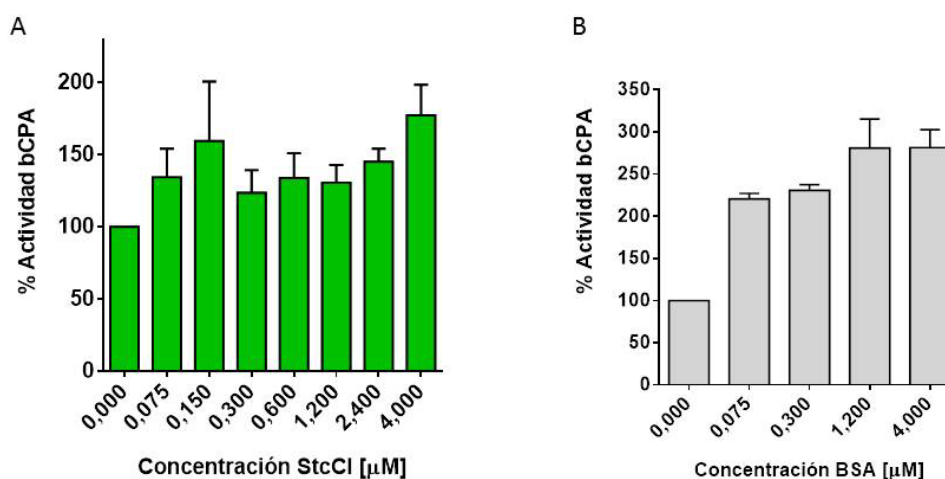
**Figura 2.8:** Espectro de masas MALDI-TOF MS, adquirido en modo reflectrón positivo, del último paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular del StcCI. Se pueden observar los picos isotópicos de la molécula estudiada con el valor de 4306,662 Da, peso molecular muy aproximado al esperado.

Utilizando el programa Sequence Editor, a partir de la secuencia conocida del StcCI se calculó que la masa teórica para el pico monoisotópico de la molécula oxidada y cargada positivamente es de 4306,828 Da. Se puede observar en la Figura 2.8 que los picos isotópicos del StcCI purificado presentan un valor de 4306,662 Da, tamaño muy aproximado al esperado. Se observa de esta manera que los métodos elegidos para la purificación del StcCI son efectivos para la obtención de la molécula con un alto grado de pureza.

### 2.3 Ensayos de actividad inhibitoria de StcCI

Para evaluar la actividad inhibitoria del StcCI recombinante, se realizaron los ensayos de inhibición de CPA en presencia del sustrato colorimétrico AAFP. Como muestra la Figura 2.9 A, no pudo detectarse actividad para el StcCI expresado. Por el contrario, se observó que la adición del StcCI generaba pendientes mayores a la observada en la cubeta control (conteniendo CPA y sustrato, sin adición de muestra), lo que implicaría una “activación” de CPA por parte del StcCI. Ante lo inesperado de estos resultados, decidimos

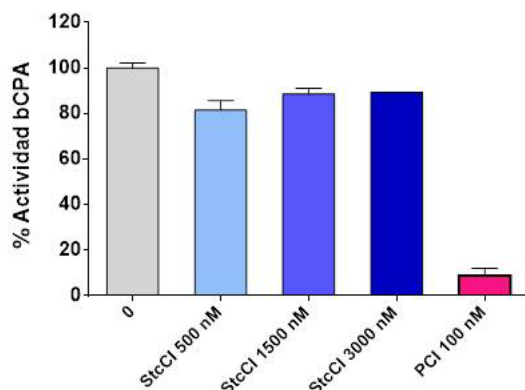
incorporar controles adicionales para descartar efectos inespecíficos. Es así que se hicieron ensayos de actividad de CPA en presencia BSA en concentraciones similares y el mismo buffer en que se encuentra el StcCl. En este caso se observó activación similar a la observada al ensayar el StcCl (Figura 2.9 B), descartando un efecto específico del StcCl.



**Figura 2.9:** Actividad de CPA en presencia de StcCl y BSA. (A) Actividad de CPA en presencia de StcCl, (B) Actividad de CPA en presencia de BSA.

En este contexto, se decidió utilizar un sustrato alternativo el cual es frecuentemente utilizado para medir actividad de carboxipeptidasas: N-(3-(2-furil) acrilil)-L-fenilalanil-fenilalanina (FAPP) (Tanco S. 2010). Para seguir la hidrólisis de este sustrato las medidas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 336 nm.

En la Figura 2.10 se puede observar que al poner en contacto CPA con StcCl, en una concentración de 500 nM, la actividad carboxipeptidasa solo se reduce en un 20%. Sin embargo, al aumentar la concentración de StcCl a 1500 o 3000 nM no se produce la disminución esperada de la actividad CPA. Al no observar un efecto dosis-respuesta en la actividad inhibitoria del StcCl, descartamos que la proteína recombinante del StcCl posea actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.



**Figura 2.10:** Actividad de CPA en presencia de StcCI utilizando el sustrato FAPP. Como control positivo de inhibición se utilizó el PCI en una concentración de 100 nM.

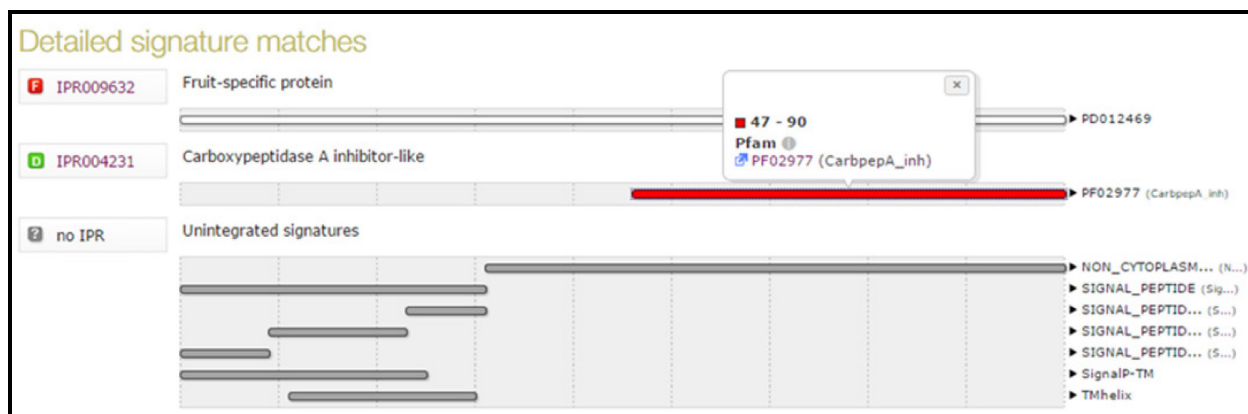
Como control de inhibición se utilizó PCI, en una concentración en el ensayo de 100 nM, observando que la actividad de CPA disminuye hasta un 10% del valor original. En estos ensayos se utilizó una concentración de bCPA de 0,85 nM y de sustrato FAPP 200  $\mu$ M.

Además de ensayar actividad inhibitoria con CPA, se ensayó actividad inhibitoria frente carboxipeptidasa B porcina (pCPB). En este caso se utilizó el sustrato colorimétrico N-(4-Metoxifenilazoformil)-Arg-OH y los resultados obtenidos fueron similares a los observados con bCPA. Por lo tanto, también se descarta que StcCI posea actividad inhibitoria de carboxipeptidasas de tipo B. En estos ensayos se utilizó una concentración de pCPB de 4,4nM y de sustrato 100  $\mu$ M.

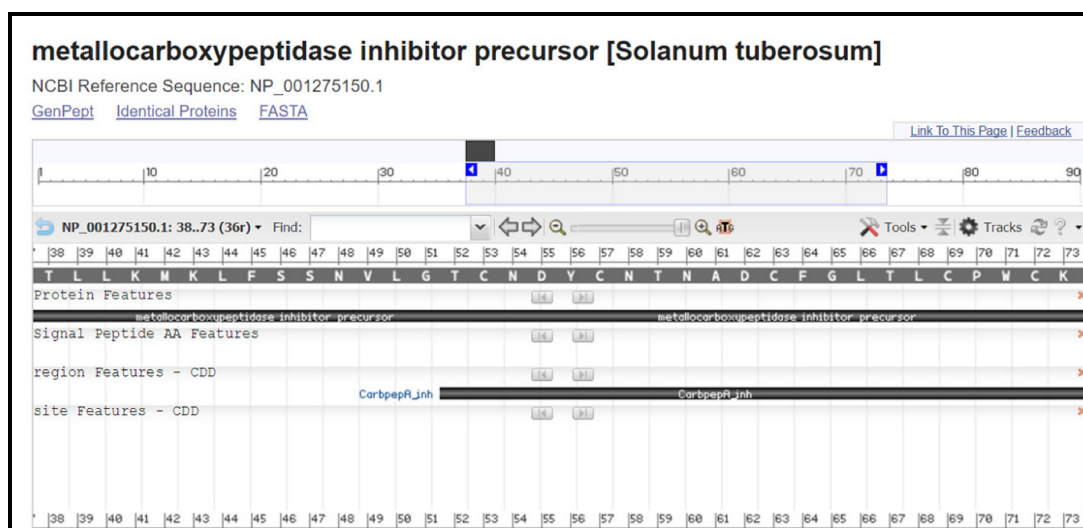
### 2.3 Expresión de una variante del StcCI: 5N-StcCI

En busca de una explicación en la bibliografía acerca de la falta de actividad del StcCI, se encontró un artículo de Cavallini y colaboradores en el que se estudiaron los efectos anti-angiogénicos de dos mini-proteínas (tipo-knot) de tomate (Cavallini C 2011). Las secuencias de estas miniproteínas, TCMP-1 y TCMP-2 poseen homología con PCI y con StcCI respectivamente (ver Figura 2.11).





**Figura 2.13:** Resultado de Uniprot al analizar la proteína NP\_001275150.1, secuencia de la cual deriva el StcCI. Para esta proteína, Pfam predice un inhibidor de carboxipeptidasas a partir del residuo 47 hasta el residuo 90. Esto suma 44 residuos, en vez de los 39 que posee nuestro constructo StcCI, debido a la presencia de 5 residuos extra en el extremo N-terminal.



**Figura 2.14:** Resultado de NCBI al analizar la proteína NP\_001275150.1, secuencia de la cual deriva el StcCI. Se puede observar que la región presentada como “*carboxypeptidase inhibitor*” se inicia a partir de la secuencia TCNDYCN.

Dado que la forma extendida del TCMP-2 presentaría actividad inhibitoria de CPA de acuerdo a Cavallini y col. (Cavallini C 2011), esos residuos extra en el extremo N-terminal del inhibidor podrían ser importantes para la función de la proteína. Es posible que esos residuos no participen directamente en la interacción con la carboxipeptidasa pero sí para el correcto plegado de la misma. De hecho, en el caso del PCI, existe un estudio en el que se hidrolizan 5 residuos en el extremo N-terminal de la proteína nativa, manteniendo intactos los puentes disulfuros de la misma y su actividad inhibitoria de CPA. Sin embargo, cuando este PCI truncado en el N-terminal fue reducido y luego refoldado (es decir, puesto en las condiciones redox necesarias para permitir



su plegado), la proteína no logró volver a plegarse en su forma nativa y tampoco recuperó su actividad inhibitoria (Venhudova 2001). Basándonos en este estudio, hipotetizamos que al igual que para el PCI, cinco residuos en el extremo N-terminal del StcCI podrían ser un factor determinante para el correcto plegado de esta molécula y, por lo tanto, para su actividad inhibitoria. Por este motivo decidimos expresar una nueva forma del StcCI (a la que llamamos 5N-StcCI), con la misma secuencia expresada previamente, pero incorporando los 5 residuos extra al N-terminal (Figura 2.15).

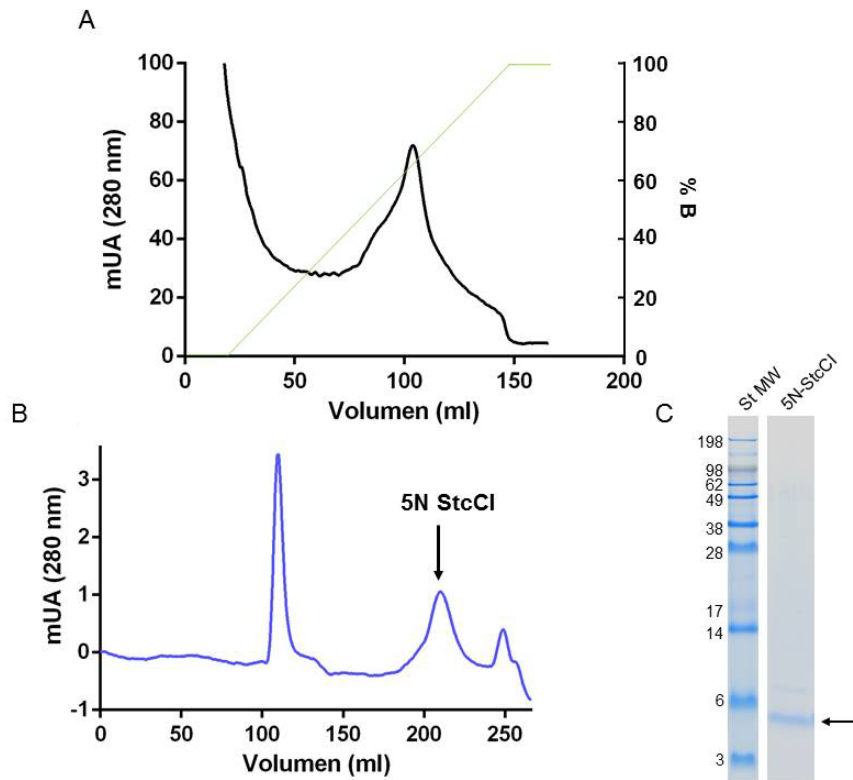
|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>5N-StcCI</b> | SNVLGTCNDYCN TNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP |
| <b>StcCI</b>    | TCNDYCN TNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSLLP      |

**Figura 2.15:** Secuencias de 5N-StcCI y StcCI.

Para realizar la expresión heteróloga de esta proteína se generó un constructo de expresión en el vector pIN-III OmpA3, utilizando la misma estrategia utilizada para el StcCI. Una vez obtenido (y confirmado mediante secuenciación), el constructo fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) y se realizó su expresión como fue descrita para el PCI Chu y StcCI. El sobrenadante del medio de expresión, se separó por centrifugación y se puso en las condiciones redox necesarias para permitir el plegado de la proteína de interés.

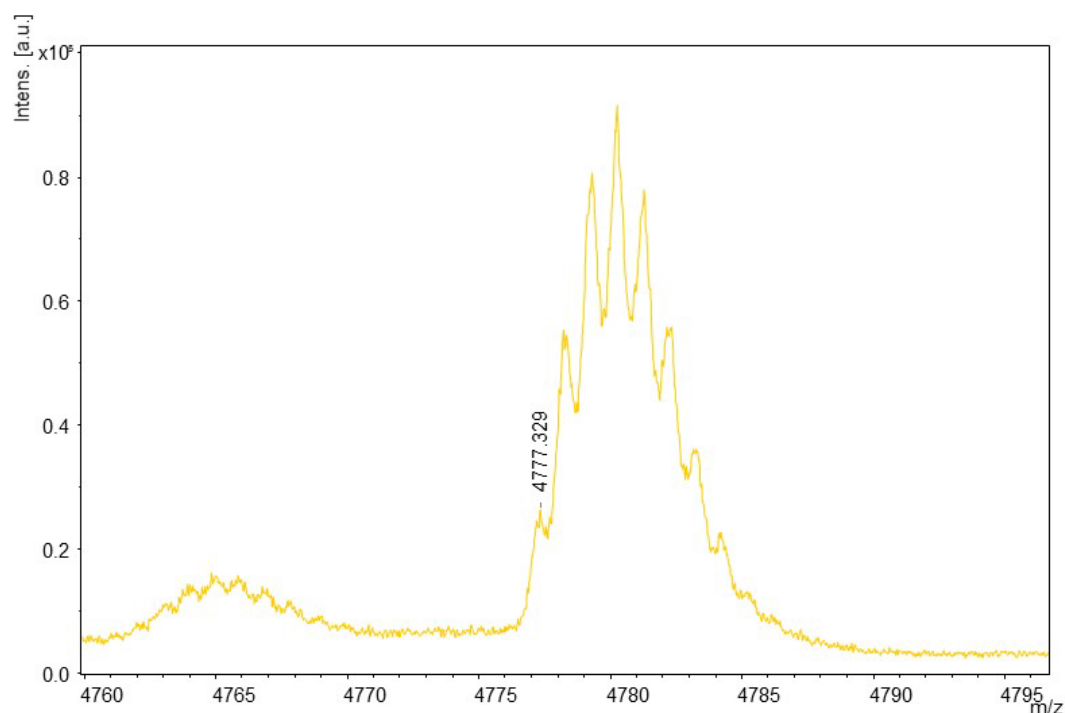
### 2.3.1 Purificación de 5N-StcCI

Para aislar la molécula expresada, se llevaron a cabo una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de exclusión molecular (Figura 2.16 A y B). Los picos que resultaron de ambas cromatografías se analizaron mediante espectrometría de masas. La masa molecular esperada para el 5N-StcCI se calculó mediante el programa Sequence Editor, deduciendo una masa monoisotópica para la molécula oxidada y cargada positivamente de 4777,07 Da. Además, se realizó un gel de tricina del eluido (concentrado 20 veces) de la cromatografía de exclusión molecular (Figura 2.16 C).



**Figura 2.16:** Purificación de 5N-StcCl. (A) Cromatograma obtenido de la purificación del intercambio catiónico. (B) Cromatograma obtenido de la purificación mediante exclusión molecular, con una flecha se encuentra señalado el pico donde se encontró el 5N-StcCl. (C) Gel de tricina donde se observa el estándar de peso molecular (St MW) y sus valores en Da; y la muestra proveniente del pico eluido de la cromatografía de exclusión molecular. La banda señalada con una flecha corresponde al 5N-StcCl.

Como se puede observar en el gel de la Figura 2.16 C la proteína purificada se observa por debajo de los 6 kDa. A su vez, mediante espectrometría de masas también se deduce una masa de 4777,329 Da de acuerdo a lo esperado.

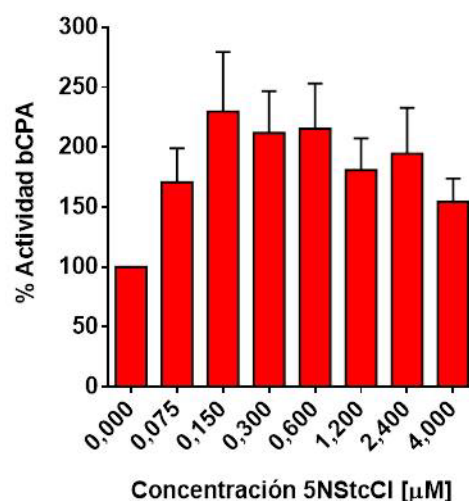


**Figura 2.17:** Espectro de masas MALDI-TOF MS adquirido en modo reflectrón positivo del último paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular del 5N-StcCl. Se pueden observar los picos isotópicos de la molécula estudiada con el valor de 4777,329 Da; peso molecular muy aproximado al esperado.

## 2.4 Ensayos de actividad inhibitoria de 5N-StcCl

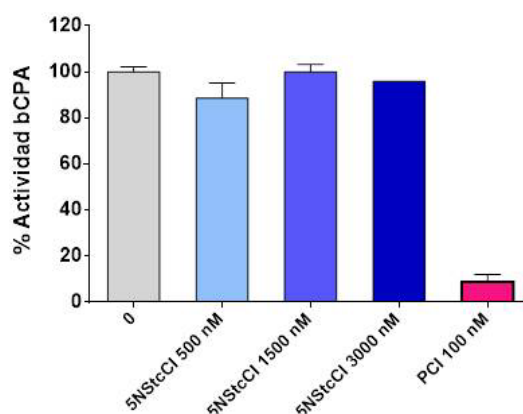
Se realizaron ensayos para detectar la actividad inhibitoria de 5N-StcCl sobre CPA bovina en presencia del sustrato colorimétrico AAFP.

Al realizar los ensayos de actividad inhibitoria con CPA se obtuvo un resultado similar al obtenido con el StcCl (Figura 2.18). Al poner en contacto el 5N-StcCl con CPA, se observa un aumento en la velocidad de desaparición del sustrato (comparado con el control de CPA sola); lo que se interpretaría como una “activación” de la enzima. De hecho, en la Figura 2.18 se observan porcentajes de activación de CPA de hasta 225%. Se realizó también en este caso un ensayo control con BSA y se obtuvieron resultados similares.



**Figura 2.18:** Actividad de CPA en presencia de 5N-StcCl con el sustrato AAFP.

Como en el caso de StcCl, se procedió a ensayar la actividad inhibitoria del 5N-StcCl utilizando como sustrato colorimétrico alternativo al FAPP. La desaparición del color del sustrato fue analizada a una longitud de onda de 336nm. En este caso, se puede observar que al incorporar 500 nM de 5N-StcCl, la actividad de CPA disminuye solo un 10% del total; sin embargo, al aumentar la concentración a 1500 y 3000nM no se observa una disminución aún mayor. Estos resultados indicarían que el 5N-StcCl no es un inhibidor de CPA.



**Figura 2.19:** Actividad de CPA en presencia de 5N-StcCl utilizando el sustrato FAPP.

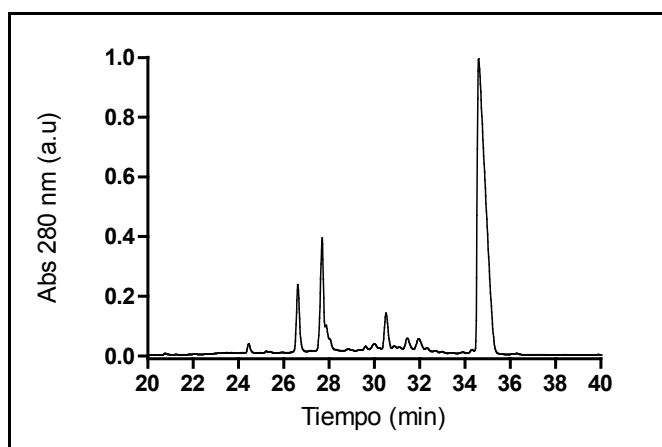
También en este caso se ensayó actividad inhibitoria frente a pCPB y los resultados obtenidos fueron similares a los observados con bCPA. Por lo tanto, se descarta también que el 5N-StcCl posea actividad inhibitoria de carboxipeptidasas de tipo B.

## 2.5 Estudio del plegado oxidativo de StcCl y 5N-StcCl

Una vez realizados los ensayos de actividad inhibitoria y comprobado que las moléculas estudiadas no poseen actividad inhibitoria de CPA, se procedió a realizar sobre las mismas ensayos de *folding* o plegado de proteínas. Un correcto plegado de la proteína recombinante es de vital importancia para asegurar que la proteína expresada posee la actividad enzimática/biológica que la misma posee en su contexto biológico. Existe la posibilidad de que el StcCl y 5N-StcCl recombinantes no presente actividad inhibitoria debido a problemas en su plegamiento.

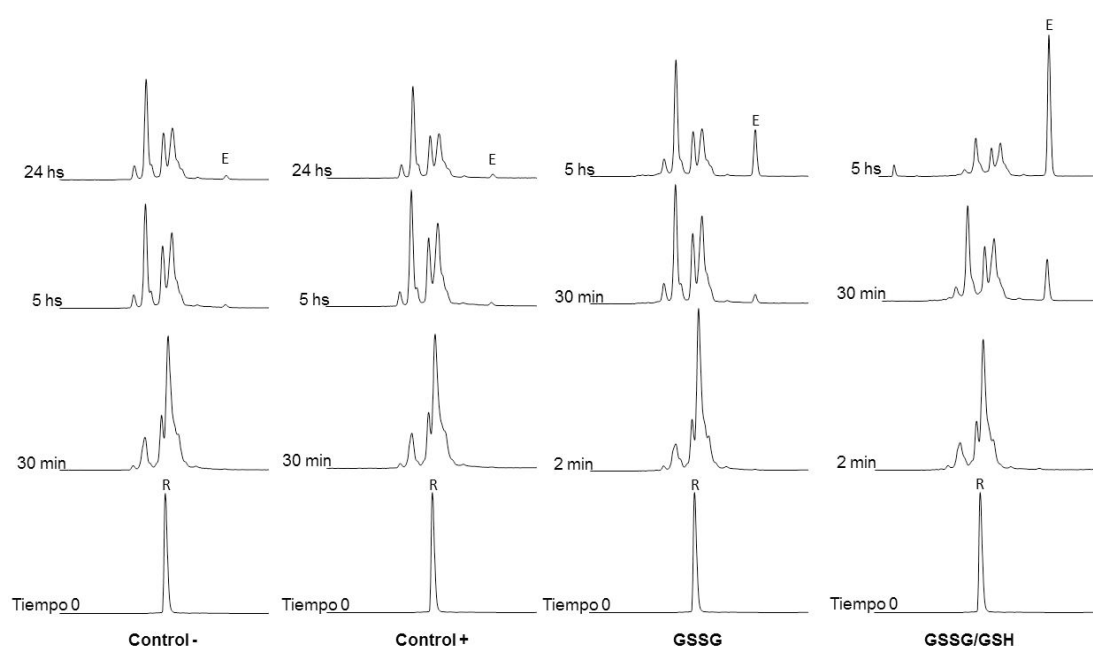
El objetivo de este ensayo fue observar el comportamiento de las moléculas en diferentes condiciones de oxido-reducción y determinar si una especie diferente a la que se obtiene en las purificaciones aparece en este contexto.

Para obtener la cantidad de proteína necesaria para realizar el ensayo de folding, se realizó una purificación de ambos inhibidores mediante RP-HPLC. La muestra obtenida de la cromatografía del intercambio catiónico, se inyectó en cuatro ocasiones en una columna C8. En cada caso, se colectó el pico mayoritario y la identidad del StcCl o 5N-StcCl se comprobó por MALDI-TOF MS (Figura 2.20). Se determinó la concentración de proteína midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar. Para cada proteína, se combinaron los eluidos de los 4 RP-HPLC, se liofilizó la muestra y se obtuvieron en el orden de 0,260 mg de proteína.



**Figura 2.20:** Cromatograma de purificación por RP-HPLC de StcCl. El pico purificado se observa entre los min. 34 y 36. Por medio de MALDI-TOF MS se identificó el StcCl en ese pico.

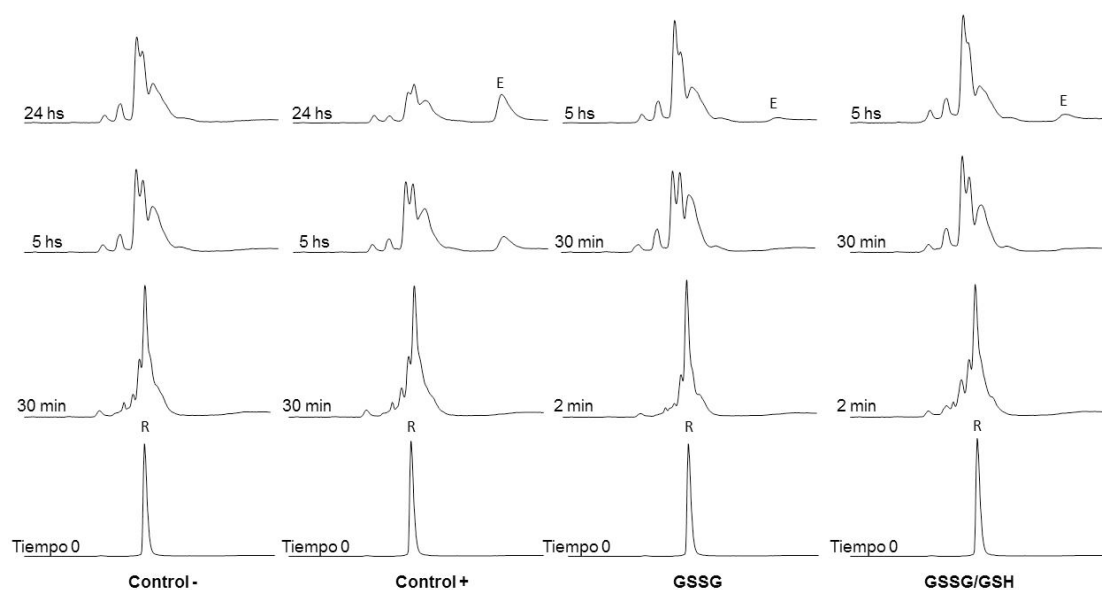
Durante el ensayo de *folding*, se incubó el StcCl o 5N-StcCl en presencia de DTT y urea para producir el desplegado y reducción de la molécula. Luego se desaló cada muestra mediante una cromatografía utilizando una columna Hi trap desalting y la proteína eluída se incubó a temperatura ambiente en ausencia (Control -) y presencia de agentes redox: 2-mercaptoetanol 0,25 mM (Control +), GSSG 0,5 mM, o GSSG 0,5 mM / GSH 1 mM. Para monitorear el folding, se retiraron alícuotas a distintos tiempos y las reacciones fueron detenidas mediante el agregado de TFA hasta una concentración final de 0,7%. Finalmente, las muestras fueron analizadas por RP-HPLC.



**Figura 2.21:** Plegado oxidativo de StcCl. Cromatogramas de RP-HPLC de los intermediarios acumulados durante el plegado oxidativo del StcCl. Las reacciones fueron llevadas a cabo en Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 en ausencia (Control -) o presencia de 2-mercaptoetanol (Control +), en presencia de GSSG o de una mezcla de GSSG/GSH. Se encuentran indicados los tiempos de retención de la forma estable (E) y la forma totalmente reducida o desplegada (R).

Como se puede observar en la Figura 2.21, para el StcCl tanto en ausencia (Control -) como en presencia (Control +) de 2-mercaptoetanol existen intermediarios heterogéneos y solo un porcentaje muy bajo de la proteína alcanza su estado estable (E). Como era esperado, la incorporación de un agente oxidante (glutación oxidado, GSSG), favorece la formación de los

intermediarios de uno, dos y tres puentes disulfuros, a través de los cuales se acelera el proceso de plegado (a las 5 h se observa un gran porcentaje de la especie en estado estable). Y por último la presencia del par GSSG/GSH favorece aún más la constitución de la especie estable de la molécula estudiada, previniendo la acumulación de intermediarios.

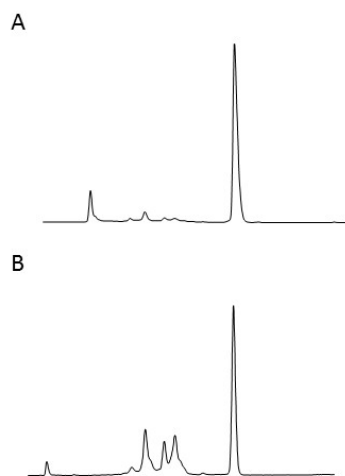


**Figura 2.22:** Plegado oxidativo del 5N-StcI. Cromatogramas de RP-HPLC de los intermediarios acumulados durante el plegado oxidativo de 5N-StcI. Las reacciones fueron llevadas a cabo en Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 en ausencia (Control -) y presencia de 2-mercaptoetanol (Control +), GSSG, y GSSG/GSH. Se encuentran indicados los tiempos de retención de la forma estable (E) y la totalmente reducida o desplegada (R).

En la Figura 2.22 se puede observar que, a diferencia del StcI, para el ensayo de folding del 5N-StcI en presencia de 2-mercaptoetanol (Control+) se comienza a observar la especie estable al cabo de 5 h, mientras que a las 24 h se observa que este pico es mayoritario con respecto a los intermediarios. Por el contrario no se observa un aumento en la forma estable (E), al menos luego de 5 h, en presencia de GSSG o el par GSSG/GSH. Ante nuestra hipótesis de que la extensión de cinco residuos en el extremo N-terminal podría explicar presencia de actividad del inhibidor expresado por Cavallini y colaboradores, estos ensayos indicarían que el 5N-StcI no presenta ventajas en términos de folding respecto del StcI. Es más, para las condiciones con GSSG o el par

GSSG/GSH el 5N-StcCl presenta una cinética de folding mucho más lenta que para el StcCl.

El proceso oxidativo de plegado observado en este estudio y en varios estudios anteriores realizados en moléculas ricas en cisteínas (Chatrenet B 1993, Chang 1994, Chang 1995, Chang 1996, Venhudova 2001, Arolas 2009) podría ser interpretado de acuerdo con la teoría del embudo de plegamiento (Baldwin 1994, Dill KA 1997). Esta teoría explica que a través de eventos concomitantes tales como paisajes de baches energéticos (*bumpy energy landscapes*) con trampas cinéticas y barreras energéticas, las proteínas se pliegan en el estado nativo mediante múltiples caminos en el espacio conformacional. El plegado oxidativo podría proceder desde el estado reducido atravesando progresivamente por más especies estables; termodinámicamente hablando: intermediarios de uno, dos, tres, puentes disulfuros (*scrambled species*). Estas especies son los picos observados en los cromatogramas entre la especie reducida y la especie nativa.

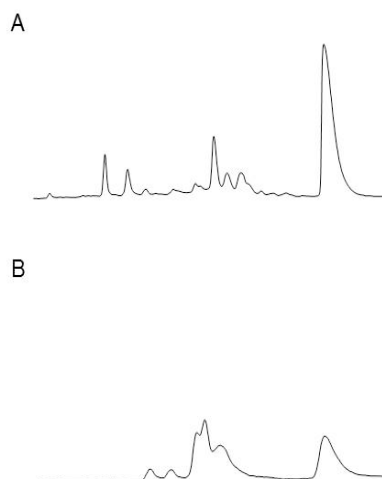


**Figura 2.23:** Comparativa entre el StcCl purificado por intercambio catiónico y las especies generadas luego del ensayo de folding. (A) Cromatograma HPLC de una muestra del StcCl purificado mediante intercambio catiónico. (B) Cromatograma del producto del plegado del StcCl en presencia del par GSH/GSSG durante 5 h.

En las Figuras 2.23 y 2.24 se presentan los cromatogramas de StcCl y 5N-StcCl purificados por intercambio catiónico (A), y los cromatogramas con las especies generadas en el ensayo de folding (en presencia de GSH/GSSG



en el caso del StcCl o en presencia de 2-mercaptoetanol en el caso del 5N-StcCl).



**Figura 2.24:** Comparativa entre el 5N-StcCl purificado por intercambio catiónico y las especies generadas luego del ensayo de folding. (A) Cromatograma HPLC de una muestra del 5N-StcCl purificado mediante intercambio catiónico. (B) Cromatograma del producto del plegado del 5N-StcCl en presencia de mercaptoetanol durante 24 h.

Se puede observar que para ambas proteínas el pico de la forma mayoritaria obtenida durante el ensayo de folding es coincidente con el pico de la especie purificada (y usada para el ensayo de inhibición). Es decir, esto significa que las especies mayoritarias generadas en el ensayo de *folding* presentan el mismo plegado que las proteínas purificadas y ensayadas. Como el plegado de las proteínas ricas en puentes disulfuro depende principalmente de las condiciones redox, este ensayo nos demuestra que las proteínas utilizadas en los ensayos de inhibición poseen el plegado mas óptimo al que pueden llegar en función de su secuencia primaria. Por lo tanto, a pesar de que no hemos obtenidos resultados de actividad inhibitoria con estas moléculas, esto indicaría que la falta de actividad no podría explicarse por problemas de plegado de las proteínas recombinantes.

Un estudio para la determinación de los puentes disulfuro observados en cada especie aportaría mayor información acerca del folding de las proteínas recombinantes (o de las especies intermediarias en el proceso de plegado de estas proteínas).

## 2.6 Modelado de StcCI y su interacción con CPA

Esta parte del trabajo se realizó durante una estancia de seis semanas en el laboratorio de Biología estructural, bioinformática y descubrimiento de fármacos (*Structural biology, bioinformatics and drug discovery*) en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, Reino Unido. El trabajo fue llevado a cabo gracias a la supervisión del profesor Tom Blundell, jefe del laboratorio, y Sony Malhotra, estudiante de doctorado.

### 2.6.1 Modelado en base a la estructura 2HLG

Se decidió realizar un modelado por homología del StcCI para evaluar la capacidad de esta proteína de inhibir o interaccionar con la CPA. Inicialmente, se obtuvo un modelo estructural de la secuencia del StcCI en base a la estructura de RMN de un péptido obtenido de tomate (código PDB: 2HLG), el cual presenta un 53,85% de identidad de secuencia con el StcCI (ver Figura 2.25).

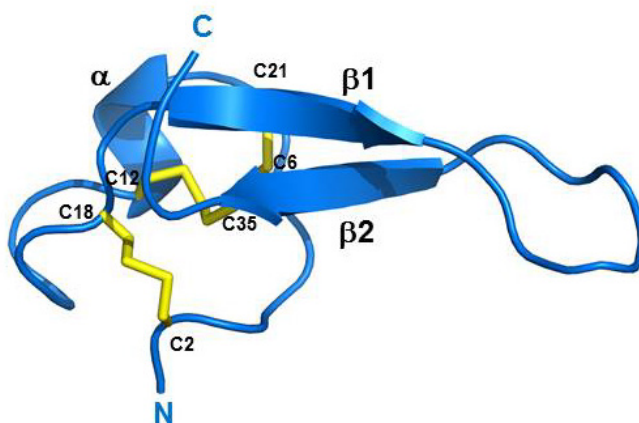
La estructura 2HLG se encuentra depositada en el PDB pero no existe un artículo que la describa (o describa la actividad biológica de este péptido). Esta secuencia se corresponde con gran parte de la secuencia de TCMP-2, la miniproteína de tomate que estudiaron Cavallini y colaboradores (Cavallini C 2011). La gran diferencia radica en que 2HLG no posee en su estructura los cinco residuos aminoacídicos extra que el TCMP-2 presenta en su extremo N-terminal (Figura 2.25).

|        |  |
|--------|--|
| 2HLG   | LCNEPCSSNSDCIGITLCQFCKEKTDQYGLTYRTCNLLP      |
| TCMP-2 | TNILGLCNEPCSSNSDCIGITLCQFCKEKTDQYGLTYRTCNLLP |
| StcCI  | TCNDYCNTNADCFGITLCPWCKLKKSSSGFTYSECSSLP      |

**Figura 2.25:** Alineamiento entre las secuencias de 2HLG, TCMP-2 y StcCI. En color rojo se encuentran resaltadas las cisteínas conservadas y en verde otros aminoácidos conservados.

La calidad del modelo fue analizada mediante PDBsum (Laskowski 2001), y utilizando el gráfico de Ramachandran (Ramachandran 1968) (a través del server Procheck (Laskowski 1993), donde se evalúan las combinaciones

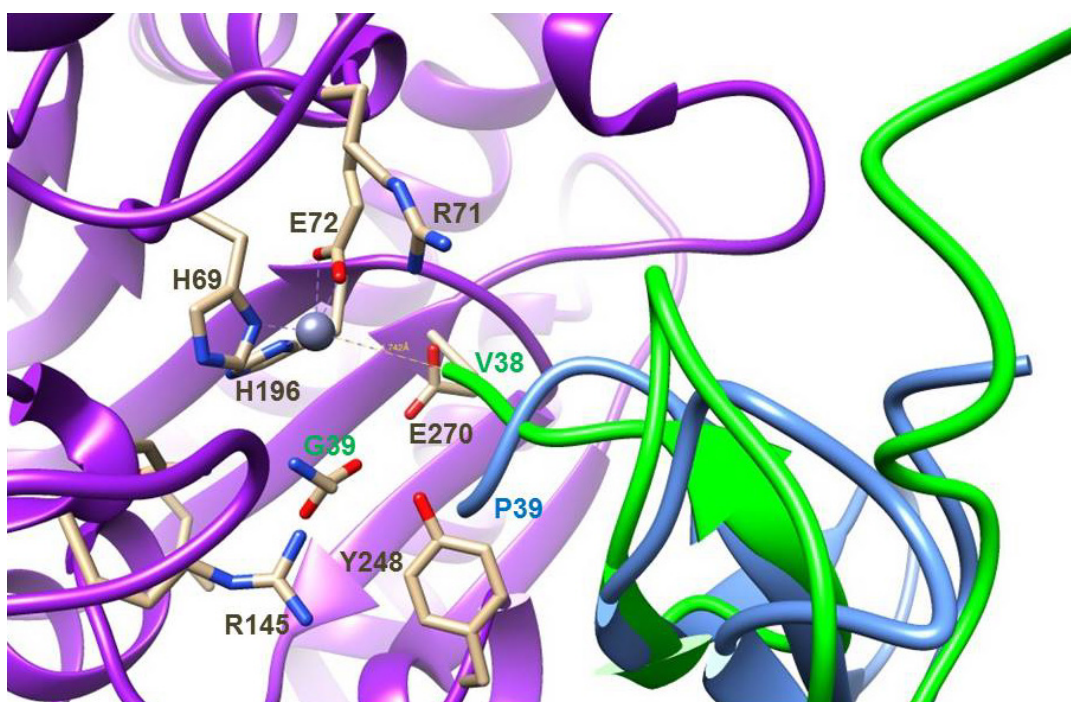
posibles de los ángulos diédricos  $\Psi$  y  $\Phi$  de los aminoácidos). Este análisis permitió observar que un 91,2% de los residuos de la estructura se encuentra en regiones favorables, lo cual es un valor aceptable para la evaluación del modelo (un valor mayor al 90% de regiones favorables de aminoácidos indica que la estructura es de buena calidad). La estructura modelada de StcCl se presenta en la Figura 2.26. Este modelo muestra que la estructura del StcCl presenta un giro alfa entre los residuos Ala10-Cys12, y dos hojas beta antiparalelas entre los residuos Trp20-Lys25 y Thr31-Ser36. Además se observan los tres puentes disulfuro entre Cys2-Cys18, Cys12-Cys35 y Cys6-Cys21.



**Figura 2.26:** Modelo estructural de StcCl en base a la estructura de RMN del 2HLG. En celeste se observa la estructura del StcCl desde el extremo N-terminal (N) hasta el C-terminal (C). En amarillo se pueden observar los tres puentes disulfuro que posee.

### 2.6.2 Superposición del modelo obtenido para StcCl sobre la estructura bCPA-PCI

En segundo lugar, se realizó un alineamiento estructural del modelo del StcCl con la estructura cristalográfica del PCI acomplexado con la bCPA (código PDB:4CPA) (Rees and Lipscomb 1982). En esta estructura cristalográfica, se presentan las interacciones entre el PCI y la CPA; por lo que al alinear estructuralmente al StcCl con el PCI se pueden estudiar las posibles interacciones del StcCl con carboxipeptidasas.



**Figura 2.27:** Modelo estructural del StcCl superpuesto a la estructura cristalográfica del complejo PCI-CPA. En color violeta se presenta la estructura de la CPA, en color verde la del PCI y en celeste la del StcCl.

En la figura 2.27 se puede observar en color violeta la estructura de la CPA y los residuos del sitio activo que interaccionan con el extremo C-terminal del PCI (verde). El átomo de zinc (gris) se encuentra coordinado por distintos residuos de la carboxipeptidasa: Glu72 (mediante dos átomos de oxígeno), His69 (mediante un nitrógeno), His196 (por medio de un nitrógeno) y Val38 (oxígeno del carboxilo terminal) del PCI. Por otro lado, se observa el residuo de Gly39 del PCI separado de la estructura, ya que este residuo es hidrolizado durante la interacción con el inhibidor quedando atrapado en el sitio activo. Los residuos Arg71, Glu270, Tyr248 y Arg145 son los residuos de la enzima que establecen las interacciones más importantes con el extremo C-terminal del PCI (entre ellas puentes de hidrógeno), permitiendo la hidrólisis de la Gly39 y estabilizando la interacción de inhibición que se produce entre el PCI y la CPA. Esta interacción se observa en los subsitos S'1, S1, S2 y S3 de la CPA donde se sitúan los residuos Gly39, Val38, Tyr37 y Pro36 del PCI, respectivamente.

Al superponer la estructura obtenida del StcCl sobre la del PCI, se puede observar que la orientación que presenta el extremo C-terminal del mismo

posee una dirección diferente a la que muestra PCI. El residuo de prolina en el C-terminal del StcCI produce un cambio en la dirección de la molécula que impide que el C-terminal interaccione con el centro catalítico de la CPA. La distancia a la que se observa el residuo de Pro39 del átomo de zinc, es tres veces mayor a la que se encuentra la Val38 del PCI. Por tal motivo no parece ser posible establecer contacto entre el átomo de zinc y la Pro39 del StcCI. Asimismo, la posición de la Pro39 no permitiría una correcta interacción con los subsitios S1' y S1 en el sitio activo de la CPA lo cual es esencial durante la inhibición de carboxipeptidasas (Rees and Lipscomb 1982, Bayés A. 2005).

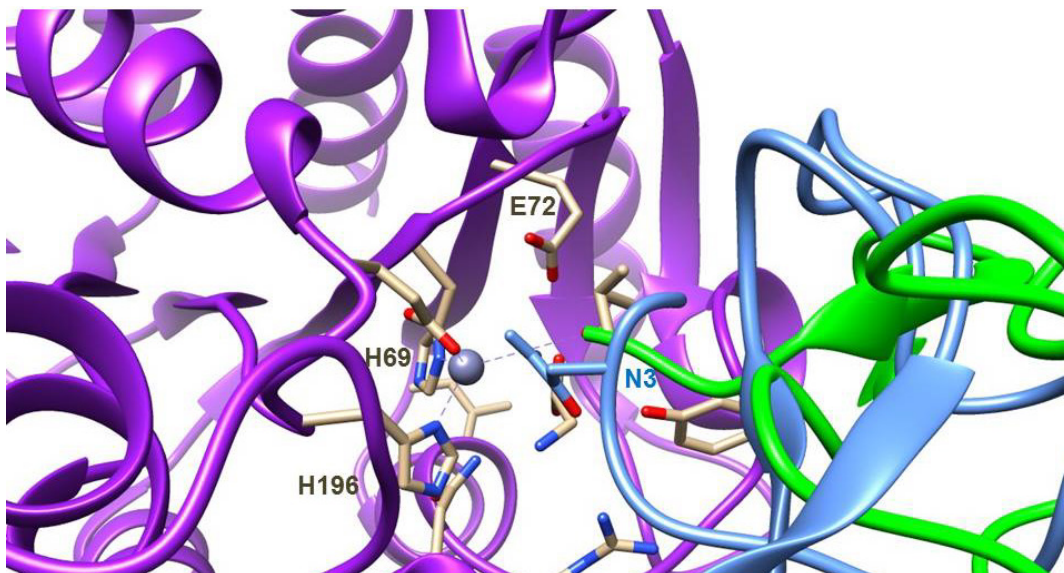
### **2.6.3 Modelado en base a la estructura 4CPA (PCI)**

Además del modelo anterior, se intentó el modelado del StcCI utilizando como molde la estructura cristalográfica del PCI en la estructura con código PDB: 4CPA. Sin embargo, el modelo obtenido no resultó ser de buena calidad, ya que al analizarlo en PDBsum se obtuvo solo un porcentaje de 67,6% de residuos en regiones favorables en el gráfico de Ramachandran, lo cual es indicativo de una baja calidad estereoquímica del modelo generado y por tal motivo no fue tenido en cuenta.

### **2.6.4 Análisis de interacción mediante *Molecular Docking***

Por otro lado, se realizaron estudios de *docking* para conseguir un modelo de interacción entre StcCI y CPA. A diferencia del alineamiento estructural del StcCI con la estructura PCI:bCPA, esta técnica permite evaluar otros mecanismos de interacción del StcCI con la carboxipeptidasa. El docking, es un método computacional que predice la orientación preferente de una molécula frente a otra cuando las dos se acercan para establecer un contacto. Es un método muy utilizado para predecir la interacción entre fármacos y una proteína blanco, que permite evaluar millones de moléculas de fármacos y encontrar aquellas que logren una correcta interacción con la proteína con la cual se desea establecer el contacto.

Para realizar este análisis se utilizó el servidor CLUSPRO (*protein-protein docking*) (Padhorny 2016) mediante el cual se pueden observar las interacciones posibles entre dos proteínas. Mediante este método no se lograron obtener modelos que muestren la interacción del StcCl con el sitio activo de la CPA a través de su extremo C-terminal. Solo se consiguieron veinte modelos y aquel que se acerca más al sitio activo, lo hace a través del extremo N-terminal del StcCl. Este modelo de posible interacción entre CPA y el N-terminal del StcCl se encuentra en la figura 2.28. Allí se observa que el residuo más cercano al átomo de zinc y por lo tanto a los residuos de CPA que establecen la interacción para lograr el contacto es la Asn3.



**Figura 2.28:** Interacción entre StcCl y CPA analizada a través de docking molecular. Se observan las estructuras de CPA, PCI y StcCl en colores violeta, verde y celeste, respectivamente.

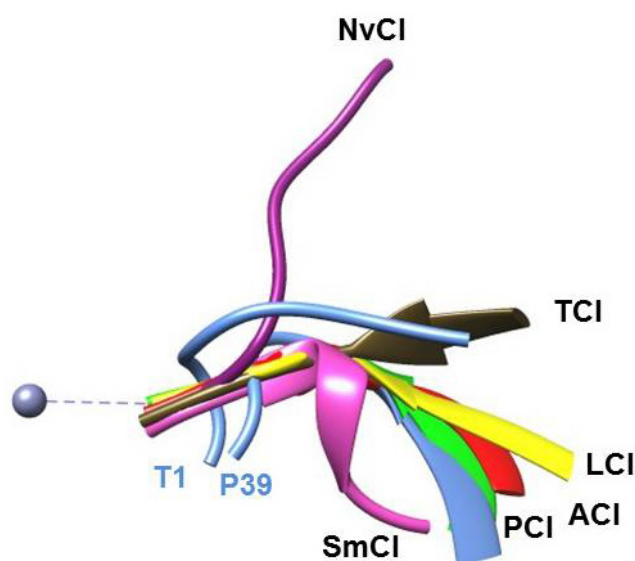
### 2.6.5 Resumen y conclusiones del modelado de StcCl y su interacción con CPA

Mediante la superposición de la estructura modelada de StcCl con la estructura del complejo PCI-bCPA, se pudo observar que la interacción del StcCl a través de su extremo C-terminal con el sitio activo de CPA no podría ser posible. Esto se debe a que la Pro39 se encuentra en una orientación poco probable de lograr interacción con el átomo de zinc y los residuos de los sitios de interacción primarios y secundarios en el centro activo de la



carboxipeptidasa. Asimismo, la generación de modelos del StcCI en base a la estructura de PCI no resultó en un modelo de calidad aceptable, lo cual indicaría que la cadena polipeptídica del StcCI no se ajustaría de forma correcta a la estructura tridimensional de PCI. Por último, a través de docking molecular, se obtuvo una estructura que podría establecer contacto con el sitio activo de CPA a través del N-terminal de StcCI. Aunque existe un inhibidor de carboxipeptidasa A que produce su inhibición a través de su extremo N-terminal (SmCI), el StcCI no posee homología con un inhibidor de este tipo, sino que posee homología con inhibidores que interaccionan a través de su extremo C-terminal. Por este motivo consideramos que este modelo no sería válido.

Para analizar estos resultados en el contexto de otros inhibidores, se compararon las estructuras cristalográficas de inhibidores de proteasas naturales en complejo con CPA bovina y distintas CPA humanas.



**Figura 2.29:** Extremo C-terminal y N-terminal de distintos inhibidores en contacto con en el átomo de zinc de CPA junto a los extremos N y C-terminal de StcCI. NvCI, Inhibidor de CPA de *Nerita versicolor*; TCI, Inhibidor de CPA de Garrapata; LCI, Inhibidor de CPA de sanguijuela *Hirudo medicinalis*, ACI Inhibidor de CPA del parásito *Ascaris*; PCI, Inhibidor de CPA de papa y SmCI, Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Sabellastarte magnifica*. En celeste se encuentra el StcCI a través de su extremo C-terminal (P39, prolina 39) y N-terminal (T1, treonina 1).

En la figura 2.29 se puede observar la interacción del extremo C-terminal del NvCI (PDB: 4A94), TCI (PDB: 1ZLH), LCI (PDB: 1DTD), ACI (PDB: 3FJU), PCI (PDB: 4CPA) y del N-terminal del SmCI (PDB: 4B29) con el sitio activo de

la CPA. En estas estructuras cristalográficas se puede ver claramente la orientación del extremo de la molécula que produce la inhibición o contacto con el sitio activo de CPA. Todas ellas, incluso el SmCI cuya inhibición además de ser de forma alostérica (ya que es un inhibidor de gran tamaño y cubre una gran zona del sitio activo) se produce mediante su extremo N-terminal, tienen una orientación similar, con apenas pequeñas desviaciones que se encuentran en el orden de los subangstroms. En ninguna de estas estructuras se observa el cambio marcado en la orientación del inhibidor generado por la Pro39 del StcCI, tampoco el cambio que se observa en el modelo que interaccionaría a través el N-terminal. De esta manera, podemos concluir que los modelos obtenidos para el StcCI no permitirían el modo de interacción que poseen los inhibidores ya descritos, ni a través del extremo C-terminal, ni a través del N-terminal. Estos resultados son compatibles con la falta de actividad detectada en los ensayos bioquímicos del StcCI recombinante.



## **Capítulo 3**

---

### **Clonado y expresión recombinante de un nuevo inhibidor de proteasas obtenido de papas andinas.**



# CAPÍTULO 3: CLONADO Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE UN NUEVO INHIBIDOR DE PROTEASAS OBTENIDO DE PAPAS ANDINAS.

## 3.1 Clonado de un inhibidor de CPA

En base al conocimiento de la existencia del PCI, inhibidor de carboxipeptida en papa (*S. tuberosum tuberosum*) estudiado previamente (Villanueva J 1998), se decidió intentar identificar la secuencia de un inhibidor de CPA de Churqueña (*S. tuberosum andigenum*). Para ello se utilizaron secuencias de las regiones más conservadas del inhibidor de carboxipeptidasa de papa (PCI) y se diseñaron cebadores o “primers” específicos para esas secuencias.

```
1  GGTAGATTACATTATGGGAAGGTGGATTACATTATTTTATTATTACCATGGCACAAAA 60
      M G R W I H I I F I I T M A Q K
61  ACTTACTATCCTTTTACCATTCTCCTTGTGGTTATTGCTGCTCATGACAATTCATTCTA 120
      L T I L F T I L L V V I A A H D N S F Y
      ATCTCCTTGTGGTTATTGCTG
121  CTCACGAAAATTTCATGTGATGGCCCAAGATGTTGTTCTACCAACGGTGACGAACTTTT 180
      S T K I H V M A Q D V V L P T V T K L F
181  TCAGCAACACGCAGATCCAATTGTAAACAACTTGTAACACACGATGATTGCTCTGG 240
      Q Q H A D P I C N K P C K T H D D C S G
241  TGCCTGGTTCTGTGAGGCATGTTGGAATTCGCGCGGACATGTTGGCCCTATGTTGGCGG 300
      A W F C Q A C W N S A R T C G P Y V G G
301  CGCCATGGCCATAGGCCTGTAATTTCATATATTATGTCTCAAGTGTGTTCTTCTTTTCG 360
      A M A I G L *
361  ACTTTTAGTCCTAAGTGACCTAAGTGAATTCGAAAAGAAGAAAAAGTATCTATGTCTT 420
      CAGAA
421  AGATACATGCTTTGTGGCTAATAATAAATCAACTATGCTTGTGATTGATATAAATATG 480
      TCTATGTACSAACACCC
```

**Figura 3.1:** Secuencia nucleotídica del preproPCI tomado de (Villanueva J 1998). En rojo y en verde se muestran los primers específicos de las secuencias conservadas que fueron diseñados para identificar la secuencia de un nuevo inhibidor en *S. tuberosum andigenum*.

Siguiendo esta estrategia, se sintetizó el ADNc a partir del ARNm aislado de brotes de papa y posteriormente se amplificó por PCR un producto de 359 pb, tamaño que se corresponde con parte de la secuencia codificante para la forma prepro de un inhibidor similar al PCI. Esto es así ya que el primer Forward fue diseñado a partir de secuencias conservadas de la región pre del inhibidor.

El segmento amplificado fue incorporado al vector de clonado pGEM-T Easy y transformado en *E. coli* (cepa XL1-Blue). Luego de obtener varias colonias, se enviaron a secuenciar cinco clones, obteniéndose una secuencia concenso para el inhibidor de Churqueña que exhibió altos niveles de identidad de secuencia con la correspondiente al PCI de *Solanum tuberosum tuberosum* (87,1% a nivel de proteico). Las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducidas se muestran en la Figura 3.2.



**Figura 3.2:** Secuencia nucleotídica del ADN codificante junto a la secuencia aminoacídica teórica de un inhibidor de carboxipeptidasa presente en brotes de Churqueña. En letras minúsculas se observa la secuencia nucleotídica, en letras mayúsculas la amino acídica, y en esta misma resaltada en negrita se encuentra la secuencia del inhibidor maduro.

La secuencia obtenida desde brotes de Churqueña fue comparada con la secuencia del PCI (*S. tuberosum tuberosum*) realizando un alineamiento por homología. En base a este análisis (Figura 3.3) se identificaron, dentro del polipéptido codificado por el ADNc obtenido, las siguientes regiones características de los inhibidores de carboxipeptidasa de papa:

- 7 aminoácidos de la pre-región de 29 aminoácidos
- 27 residuos de la pro-región N-terminal
- 39 aminoácidos correspondientes a la proteína madura
- 7 aminoácidos de extensión en el extremo C-terminal

Cabe recordar que las regiones características del PCI son:

- Una pre-región de 29 aminoácidos
- Una pro-región N-terminal de 27 residuos
- La proteína madura de 39 aminoácidos
- El extremo C-terminal de 7 aminoácidos de extensión

En el alineamiento de las secuencias se puede ver que se obtuvo parte de la pre-región, el total de la pro-región, la secuencia correspondiente al inhibidor maduro y la extensión C-terminal. Así mismo, existe un elevado grado de conservación de residuos aminoacídicos, incluyendo las cisteínas involucradas en los puentes disulfuro (Cys8-Cys12; Cys24-Cys27 y Cys18-Cys34). Por otro lado, es interesante observar que las principales diferencias entre el PCI y el inhibidor encontrado en Churqueña (a partir de ahora llamado PCI Chu), se encuentran ubicadas en la región N-terminal de la proteína madura. Si bien la región C-terminal es la que se encuentra involucrada directamente en el mecanismo de inhibición de la carboxipeptidasa (simulando la interacción con el sustrato), los cambios en la región N-terminal podrían introducir diferencias estructurales que modifiquen la estabilidad del inhibidor frente a diversos factores (temperatura, pH, fuerza iónica, digestión proteolítica) así como también a una diferencia en la cinética de inhibición.

|         | pre-región   | pro-región |
|---------|--|------------|
| PCI     | MGRWIIHIIIFIITMAQKLTILFTILLVVIAAHDNSFYSTKIHVMAQDVVLPTVTKLF |            |
| PCI Chu | -----ILLVVIAAHDNSFYSAKIHVMARDVVLPTVTKLF                    |            |
|         | proteína madura  | ext. C     |
| PCI     | QQHADPICNKPKCTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYVGGAMAIGL             |            |
| PCI Chu | QRDPICNKPKCTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYVGGAMAIGL               |            |

**Figura 3.3.** Alineamiento de la secuencia consenso del nuevo PCI Chu con la secuencia del PCI (*S. tuberosum tuberosum*). Se muestran resaltadas las zonas en que los aminoácidos no están conservados.

Se introdujo la secuencia proteica en la herramienta bioinformática ProtParam del portal de Expasy y se obtuvieron los siguientes datos característicos de la molécula:

-Coeficiente de extinción (con Cisteínas oxidadas): Abs 0,1% (=1 g/l) 2,970

-Peso molecular: 4331,83

-pI teórico: 6,70

### 3.2 Expresión heteróloga del PCI Chu

Para realizar la expresión del PCI Chu se utilizó el plásmido de expresión pIN-III con la secuencia señal OmpA en el extremo 5' del PCI Chu. Esta secuencia señal envía la proteína expresada al espacio periplásmico. Este sistema de expresión de tipo secretorio, posee ventajas significativas frente a otros sistemas. En primer lugar, el extremo N-terminal de la proteína expresada queda de forma idéntica al gen natural, esto se debe a un clivaje del péptido señal OmpA mediante una proteasa específica para esa señal y en segundo lugar, la purificación desde el medio extracelular hace que la misma sea menos compleja sin estar en medio las proteínas propias de la bacteria.

Para incorporar el péptido señal en la región N-terminal de la secuencia del PCI Chu, se realizaron tres PCRs, la primera sobre la secuencia del inhibidor aislada en la sección anterior (ahora clonada en el plásmido pGEM-T Easy) y las dos siguientes sobre el producto de PCR obtenido en el paso anterior. Luego, se incorporó esta secuencia amplificada al vector de clonado pGEM-T Easy, se realizó la transformación química en *E. coli* (cepa XL1Blue) y se obtuvieron distintos clones. Los plásmidos aislados a partir de cinco de esos clones que se enviaron a secuenciar, detectando tres clones con la secuencia correcta.

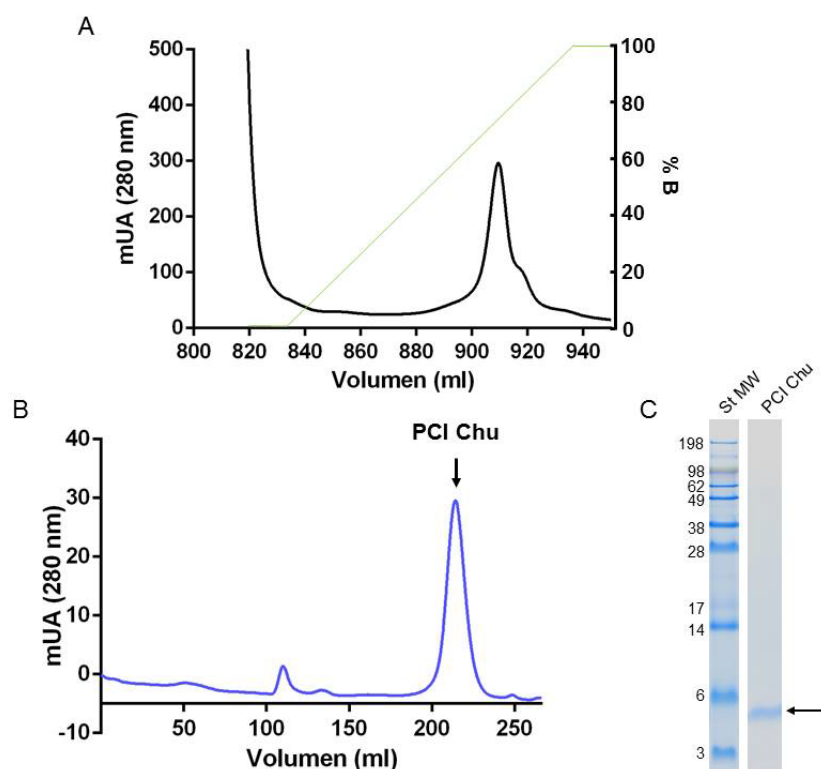
Posteriormente, en un segundo paso del clonado, cuya intención es transferir la secuencia del PCI Chu junto al péptido señal OmpA al vector de expresión, se realizó una digestión de la secuencia de interés desde el vector pGEM-T Easy utilizando las enzimas de restricción XbaI y Sall. Estas mismas enzimas fueron utilizadas para digerir el vector de expresión pIN III OmpA3. Ambos fragmentos de ADN se purificaron mediante gel de agarosa con un kit de purificación de ADN desde gel, se ligaron y transformaron en *E. coli* (cepa XL1Blue). Se seleccionó un clon con la secuencia correcta (confirmado a través de secuenciación) y se transformó en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3).

La expresión recombinante del PCI Chu se realizó en medio BAT durante 20 h a 37°C, con agitación a 250 rpm. Una vez pasado este tiempo se centrifugó el cultivo a 8000 xg durante 20 min y se recuperó el sobrenadante. Al mismo se le incorporó cisteína 4 mM (concentración final) y cistina 2 mM (concentración final) para lograr las condiciones redox necesarias para el correcto plegado de inhibidor, a través del correcto establecimiento de los puentes di-sulfuro. Luego de haber pasado toda la noche en este buffer se procedió a la purificación del PCI Chu.

### **3.2.1 Purificación de PCI Chu**

Los pasos para realizar la purificación de la proteína fueron una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de gel filtración. Para realizar el intercambio catiónico el sobrenadante con cisteína-cistina fue llevado a pH 3,5 con ácido cítrico, centrifugado y filtrado en filtro de 0,45 micrómetros. La columna de intercambio catiónico fue equilibrada con un buffer citrato de sodio 0,1 M pH 3,5, previa a la inyección de la muestra. Se procedió a realizar lavados de tres volúmenes de columna y la elución se realizó mediante un cromatoenfoque con gradiente creciente de pH. El aumento del pH se realizó utilizando un buffer fosfato 0,1 M pH 8,5. De esta manera las proteínas que quedaron retenidas por la resina y al llegar a su punto isoeléctrico se eluyen de la columna. La identidad del pico eluido se verificó mediante espectrometría de masas observando una masa molecular de 4306 Da, confirmando la presencia del PCI Chu en la fracción obtenida a pH6,5 a un 75% de buffer fosfato (Figura 3.4 A). La masa molecular esperada se calculó mediante Sequence Editor: el pico monoisotópico de la molécula oxidada y cargada positivamente debía ser de 4323,770 Da.

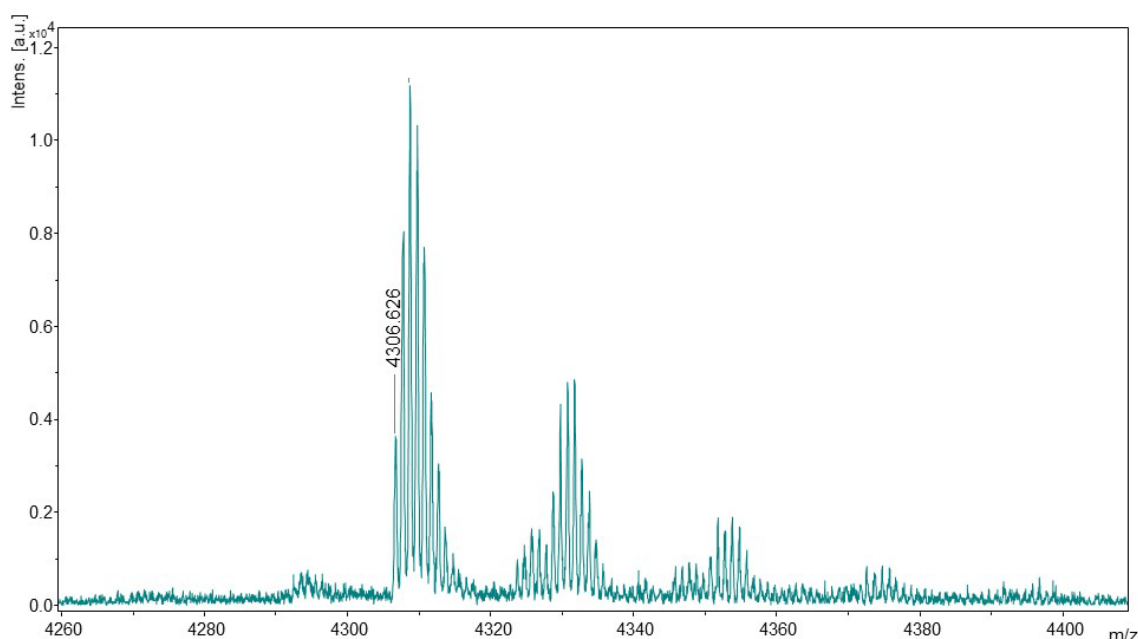
Como segundo paso de purificación se realizó una cromatografía de exclusión molecular en buffer fosfato 10 mM pH 7,5. Se inyectaron 5 ml de muestra y se analizaron las fracciones obtenidas mediante espectrometría de masas. Luego se concentró la muestra veinte veces utilizando tubos Amicon Ultra-15 de corte de 3000 Da y se realizó un gel de eletroforesis SDS-PAGE-tricina con el fin de verificar su presencia y tamaño molecular esperado.



**Figura 3.4:** Purificación de PCI Chu. (A) Cromatograma obtenido de la purificación del PCI Chu por intercambio catiónico. (B) Cromatograma obtenido del segundo paso de purificación de PCI Chu mediante gel filtración. La flecha indica el pico donde se encontró el PCI Chu en base al análisis por espectrometría de masas. (C) Gel de tricina donde se analizó el concentrado de la fracción de la cromatografía de gel filtración en la que se eluye el PCI Chu. St MW, estándar de peso molecular. La flecha señala lavanda correspondiente al PCI Chu.

Se puede observar en el gel de tricina mostrado en la Figura 3.4 C que se obtuvo a homogeneidad la molécula de tamaño esperado. Incluso por espectrometría de masas (Figura 3.5) se pueden observar los picos isotópicos de la molécula estudiada con el valor de 4306,626 Da para el pico monoisotópico, peso molecular muy aproximado al esperado de 4323,770 Da.





**Figura 3.5:** Espectro de masas MALDI-TOF adquirido en modo reflectrón positivo del último paso de purificación mediante cromatografía de gel filtración de PCI Chu.

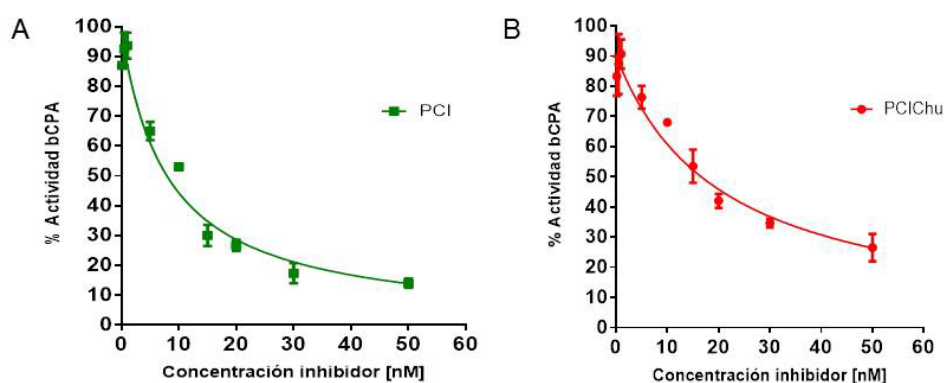
La diferencia de masa de 17,144 Da menor a la esperada podría ser una modificación que generalmente se produce en los residuos de glutamina cuando se encuentran en el extremo N-terminal de una proteína. Esta modificación produce la transformación de glutamina en ácido piroglutámico reduciendo su peso molecular.

Expasy es un portal de investigación de bioinformática ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) que ofrece una herramienta llamada Find Mod Tool la cual puede predecir modificaciones post-traduccionales producidas en los residuos de aminoácidos. En la página [http://web.expasy.org/findmod/findmod\\_masses.html](http://web.expasy.org/findmod/findmod_masses.html) se encuentran las modificaciones en los valores de masas que utiliza este servidor. Por medio de esta herramienta se logró identificar la modificación que coincidió con el cambio en el peso molecular esperado de PCI Chu.

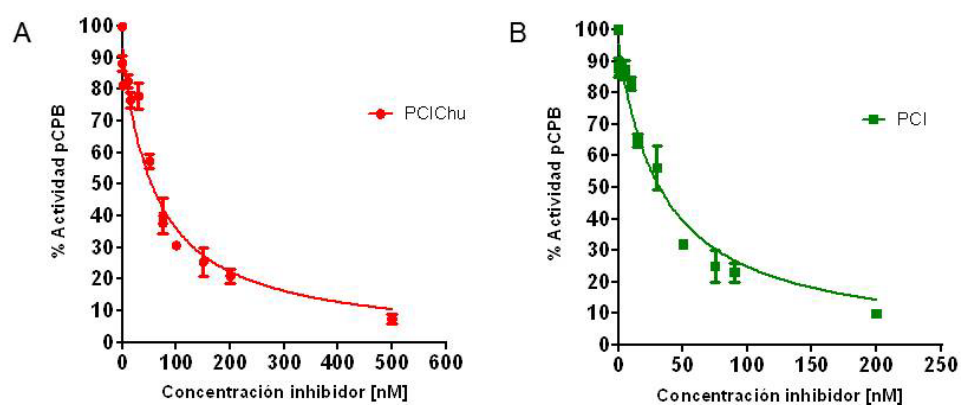
### 3.3 Cinética de inhibición

Una vez purificado PCI Chu, se procedió a testear su actividad inhibitoria de carboxipeptidasas. Fueron testeadas carboxipeptidasa A y B.

Se determinó la actividad de cada enzima en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor. Luego se realizó el cálculo de la actividad residual de cada enzima y se graficó en el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Ing USA) (Motulsky 2007) la actividad residual vs la concentración de inhibidor, obteniendo una curva dosis-respuesta. En el mismo programa se utilizó la ecuación de (Morrison 1982) para realizar el cálculo de  $K_i$  para inhibidores de tight binding (unión fuerte) de tipo competitivo.



**Figura 3.6:** Curva dosis-respuesta de PCI Chu y PCI frente a CPA bovina.



**Figura 3.7:** Curva dosis-respuesta de PCI Chu y PCI frente a CPB porcina.

**Tabla 3.1 :** Constantes cinéticas de inhibición de PCI Chu y PCI frente CPAb y CPBp

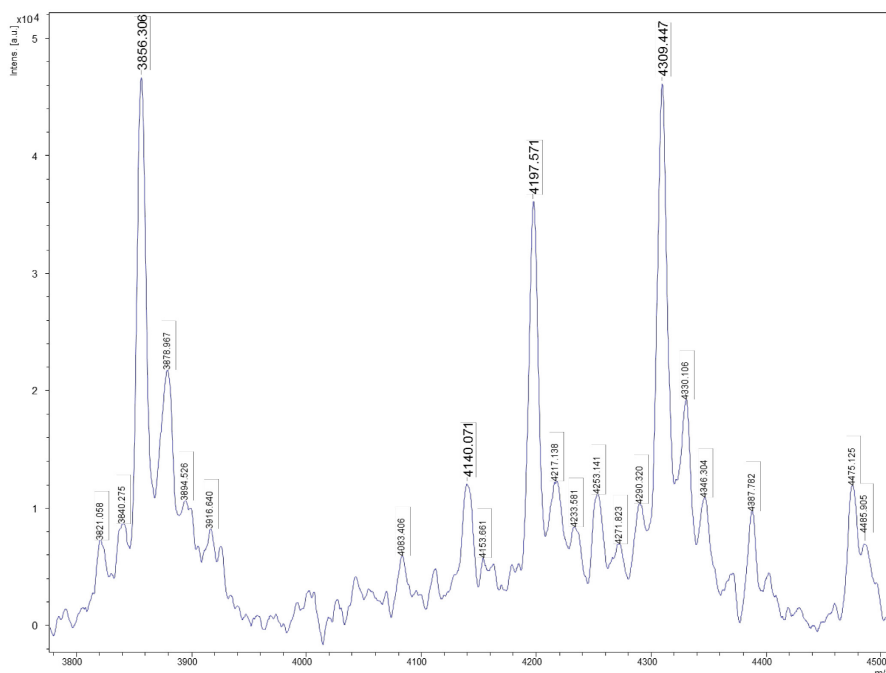
| Proteasa | PCIChu<br>$K_i$ (nM) | PCI<br>$K_i$ (nM) |
|----------|----------------------|-------------------|
| bCPA     | $10,8 \pm 1,55$      | $4,3 \pm 0,46$    |
| pCPB     | $19,8 \pm 1,82$      | $10,7 \pm 1,17$   |

Se ha obtenido en esta parte del trabajo la forma recombinante de PCI Chu y se puede observar que las constantes de inhibición tanto para CPA como para CPB poseen un valor mayor respecto al PCI.

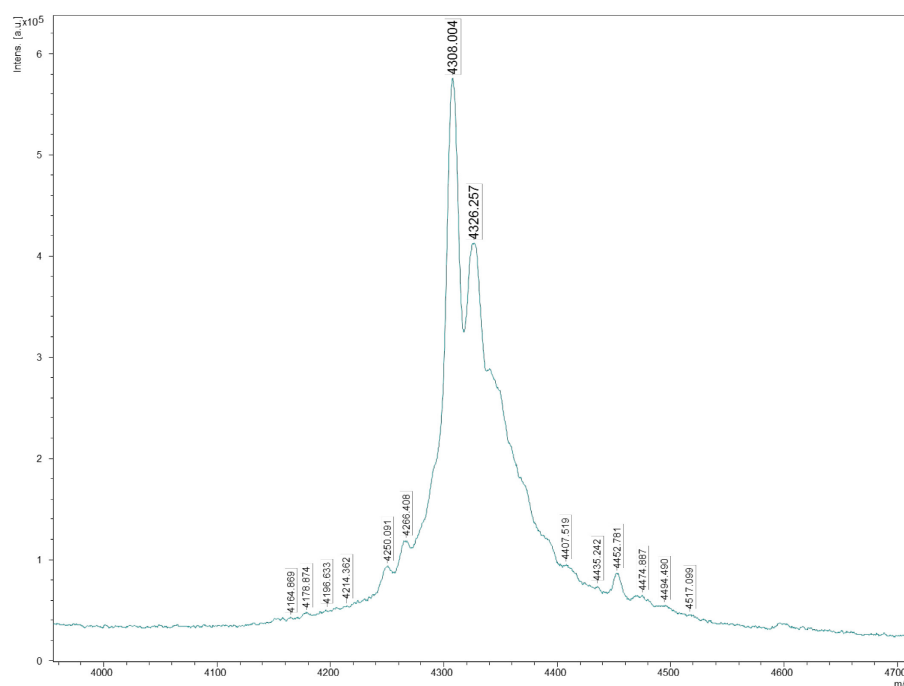
### 3.4 Cromatografía de afinidad CPA agarosa

Una vez expresado el PCI Chu, se procedió a repetir la cromatografía de afinidad con el EC de Churqueña empleando CPA-agarosa como se realizó en el capítulo 1 de esta tesis. En este caso la finalidad es identificar la proteína nativa en el EC y/o elución de la afinidad. Luego, se analizaron, mediante MALDI-TOF MS (en modo linear positivo) el EC empleado para la cromatografía, la fracción no retenida y la eluída, como así también el PCI Chu recombinante purificado.

En la Figura 3.8 se muestra el espectro de masas del EC de Churqueña usado para la cromatografía en el que destacan tres picos con mayor intensidad. La masas de los mismos tienen valores de 3856,306 Da; 4197,571 Da y 4309,447 Da.

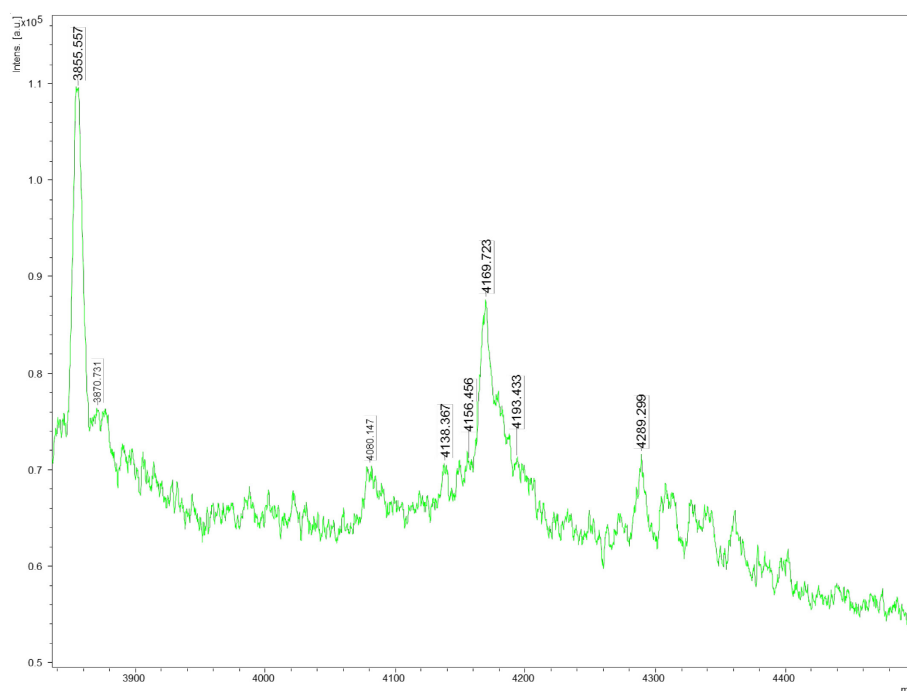


**Figura 3.8:** Espectro de masas MALDI-TOF MS del extracto de Churqueña tratado térmicamente a 100°C durante 5 min.



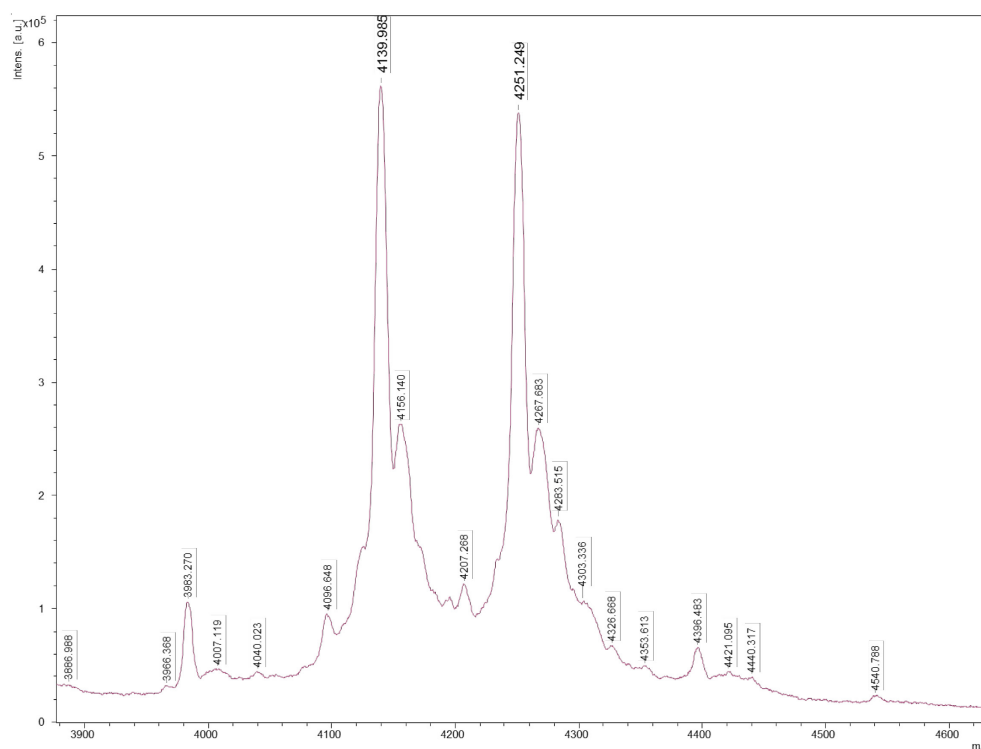
**Figura 3.9:** Espectro de masas MALDI-TOF MS del PCI Chu recombinante purificado. Se observa un pico mayoritario de 4308,004 Da.

El valor de 4309,447 Da observado en el espectro del EC de Churqueña (Figura 3.8) es muy cercano al valor obtenido para PCI Chu de 4308,004 Da (Figura 3.9) cuando se analiza la proteína recombinante por MALDI-TOF MS. Esto podría indicar la presencia del PCI Chu nativo en el EC.



**Figura 3.10:** Espectro de masas MALDI-TOF MS de la fracción no retenida de la cromatografía de afinidad CPA-agarosa.

En el espectro de masas de la fracción no retenida de la cromatografía de afinidad CPA-agarosa (Figura 3.10) se puede observar una disminución relativa de los picos de 4197,571 Da y 4309,447 Da, mientras que el pico de 3855,57 Da se observa con una intensidad relativa mayor. Esto indicaría que las proteínas de pesos moleculares de 4197,571 Da y 4309,447 Da estarían interaccionando con la CPA inmovilizada, mientras que este no sería el caso de la proteína de 3855,57 Da.



**Figura 3.11:** Espectro de masas MALDI-TOF MS de la fracción eluída a pH 12 de la cromatografía de afinidad con CPA-agarosa.

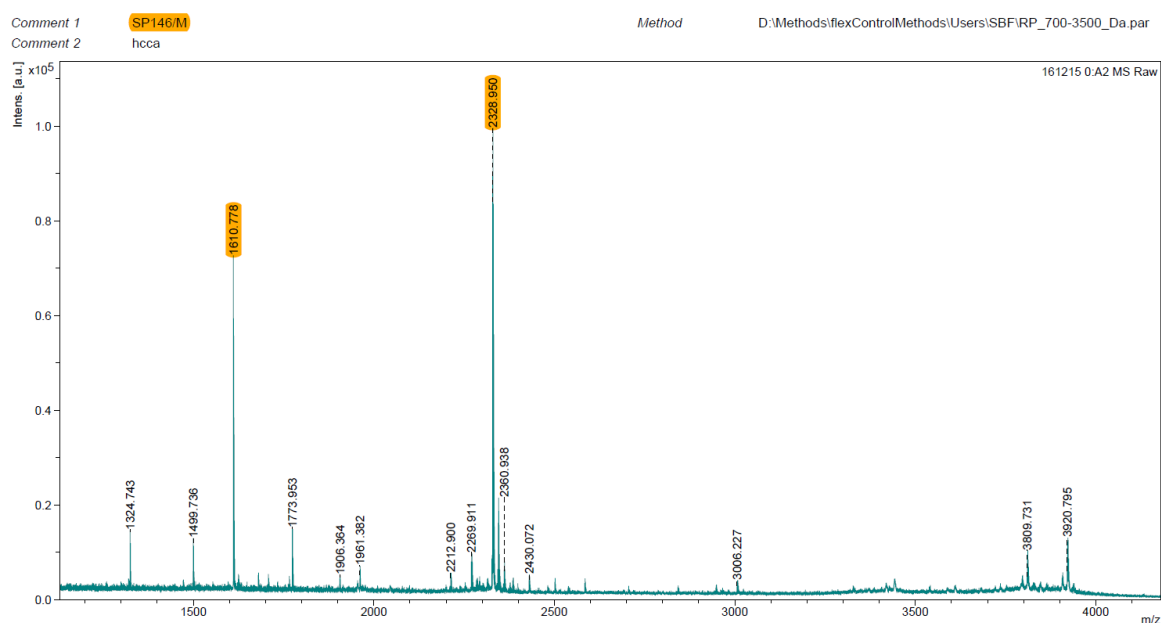
En el espectro de la Figura 3.11 se observa que de la cromatografía de afinidad de CPA se eluyen mayoritariamente dos proteínas, de 4139,985 Da y 4251,249 Da. Durante la interacción entre la CPA y el PCI está descrito que la Gly39 es hidrolizada (Ryan 1980, Marino-Buslje C. 2000). Para comprobar que es esto lo que está ocurriendo durante la cromatografía de afinidad, observamos las masas del extracto que desaparecen en el no retenido y las que aparecen en el eluído de la afinidad. La diferencia que hay entre cada una de ellas es  $4309,447 - 4251,249 = 58,198$  y  $4197,571 - 4139,985 = 57,586$ .

Este valor pareciera corresponderse con la pérdida de una Gly, lo cual en el caso del pico de 4309,447 Da es coincidente con la presencia de una Gly en el C-terminal de PCI Chu y en el caso del pico de 4197,571 también podría serlo.

Por otro lado, observamos que la diferencia de pesos moleculares entre los picos observados en el extracto inicial (o eluído de la afinidad) es del orden de 111 Da ( $4309,447 \text{ Da} - 4197,571 \text{ Da} = 111,876 \text{ Da}$  en el extracto inicial;  $4251,249 \text{ Da} - 4139,985 \text{ Da} = 111,264 \text{ Da}$  en el eluído). Esta diferencia es muy cercana al valor de 111,11 Da del piroglutamato (pGlu) N-terminal que se observó en el extremo N-terminal del PCI Chu al realizar el análisis del espectro en modo reflectrón (Figura 3.5). Por lo tanto, hipotetizamos que la molécula de 4197,571 Da podría corresponderse con el PCI Chu sin su aminoácido N-terminal.

### **3.5 Análisis de huella peptídica o PMF (Peptide Mass Fingerprinting) y secuenciación de novo PMF-MALDI-TOF-TOF/MS/MS**

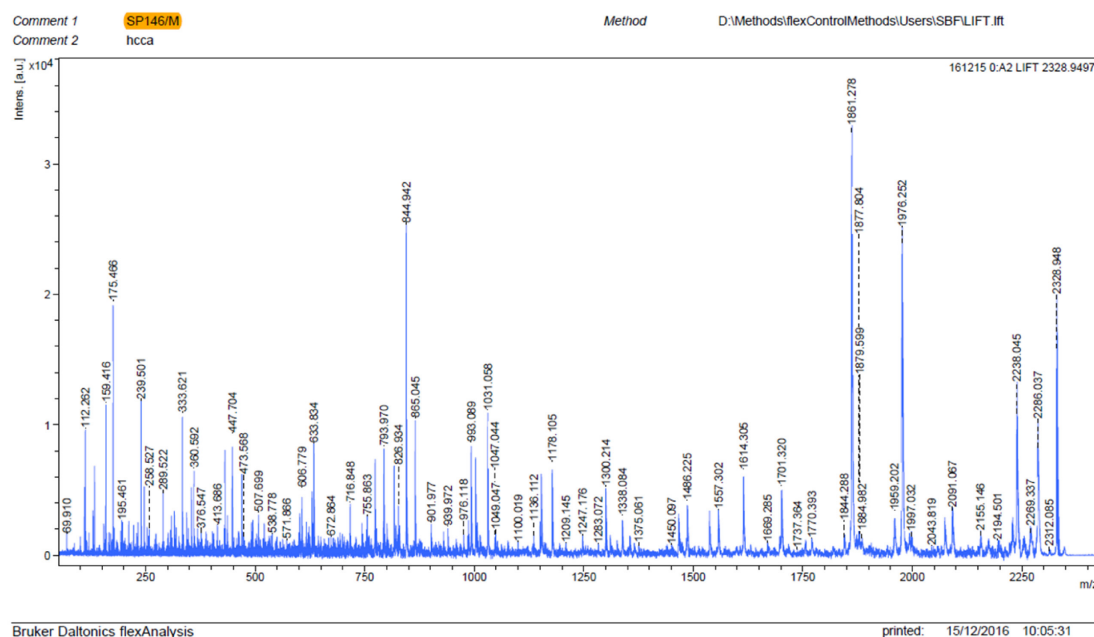
Con el fin de corroborar que los pico observados en los espectros MALDI-TOF MS analizados de la cromatografía de afinidad se corresponden con la secuencia de PCI Chu y con la misma molécula sin el pGlu N-terminal, se realizó un PMF y secuenciación de novo por MS/MS. Con este objetivo, se sembró la muestra proveniente de la elución de la cromatografía de afinidad de CPA en un gel de tricina tal como se observó en el capítulo 1, Figura 1.20, dando una única banda en el gel aunque por análisis MALDI-TOF MS se observan dos especies eluídas. Se recortó la banda obtenida y se sometió a reducción con DTT, tratamiento con iodoacetamida y digestión trípica.



**Figura 3.12:** Huella peptídica del eluido de la cromatografía de afinidad de CPA. Espectro de masas MALDI-TOF MS, obtenido luego de la digestión triptica.

En un primer análisis de búsqueda en bases de datos, los péptidos obtenidos de la huella peptídica (Figura 3.12) no obtuvieron coincidencias significativas con secuencias conocidas. Por lo tanto, se procedió a un segundo análisis, que consistió en la fragmentación por MS/MS de los péptidos mayoritarios observados en el PMF: picos de 2328,950 Da y 1610,778 Da.

E:\MALDI DATA\FXAviles\MTellechea\161215\0\_A2\1\2328.9497.LIFT\1SRef



**Figura 3.13:** Espectro de fragmentación MALDI-TOF MS/MS del péptido de 2328,950 Da.

Se puede observar en la Figura 3.13 el espectro de péptidos obtenido luego de la fragmentación del péptido de 2328,950 Da y en la Figura 3.14 el resultado de la búsqueda usando MASCOT de las similitudes de estas masas con proteínas en las bases de datos. Estos datos muestran que el péptido de 2328,950 Da se corresponde con la secuencia: THDDCSGAWFCQACWNSAR que es parte del PCI de *Solanum tuberosum tuberosum*. Este péptido también está presente en el PCI Chu.



# MASCOT Search Results

Protein View: **pdb|1H20|A**

Chain A, Solution Structure Of The Potato Carboxypeptidase Inhibitor

Database: NCBIprot

Score: **151**

Monoisotopic mass ( $M_r$ ): 4280

Calculated pI: 6.00

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Individual ions scores > 63 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of pdb|1H20|A against nr](#).

## Search parameters

MS data file: DATA.TXT

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Variable modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 48%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 XQHADPICNK PCK**THDDCSG** **AWFCQACWNS** ARTGGPYVG

Unformatted sequence string: [39 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort by ☒ residue number ☐ increasing mass ☐ decreasing mass

Show ☒ matched peptides only ☐ predicted peptides also

| Query             | Start - End | Observed  | Mr(expt)  | Mr(calc)  | ppm  | M Score | Expect  | Rank | U | Peptide  |
|-------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------|---------|---------|------|---|--|
| <a href="#">1</a> | 14 - 32     | 2328.9497 | 2327.9425 | 2327.8895 | 22.7 | 0 151   | 9.6e-11 | 1    | 1 | K.THDD <b>C</b> SGAWF <b>C</b> QA <b>C</b> WNSAR.T + 3 Carbamidomethyl (C) |

**Figure 3.14:** Resultado del motor de búsqueda MASCOT de la búsqueda de las masas generadas en la fragmentación por MS/MS del péptido de 2328,950 Da en la base de datos NCBIprot.

Si una proteína no se encuentra depositada en bases de datos, no es posible identificarla a través del motor de búsqueda MASCOT. Sin embargo, si uno presupone la secuencia de una proteína a identificar, es posible realizar una búsqueda manual de esa molécula en el espectro de fragmentación MS/MS utilizando los programas Biotoools y Sequence Editor. Este fue el caso al intentar identificar el pico de 1610,778 Da a partir de su espectro de fragmentación (Figura 3.15). Para esto, se buscó si este espectro coincidía con algún péptido de la secuencia de PCI Chu. Para lograr la identificación, se tuvo en cuenta además de la carbamidometilación de Cys producida por el tratamiento con iodoacetamida, la formación de ácido piroglutámico a partir de laGln en posición 1. De esta manera, se logró identificar al pico de 1610,778 Da como el péptido pERDPDPICNKPCK correspondiente al extremo N-terminal del PCI Chu (Figura 3.16).



correspondiente a la secuencia THDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYV y otro de secuencia QRDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSAR. De esta manera se logró identificar la secuencia completa del PCI Chu (Figura 3.17).

| Mono MH+ | Dev(Da) | Rango   | Parciales | Secuencia   |
|----------|---------|---------|-----------|---|
| 1610,741 | 0,037   | [1-13]  | 1         | QRDPDPICNKPKCK (1 * Piro-glu (N-term), 2 * Carbamidometil (C))                    |
| 2328,897 | 0,053   | [14-32] | 0         | THDDCSGAWFCQACWNSAR (3 * Carbamidometil (C))                                      |
| 3006,181 | 0,046   | [14-39] | 1         | THDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYV (3 * Carbamidometil (C))                                |
| 3920,620 | 0,175   | [1-32]  | 2         | QRDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSAR (1 * Piro-glu (N-term), 5 * Carbamidometil (C)) |

**Secuencia identificada: QRDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYV**

**Figura 3.17:** Resumen de los péptidos identificados en la huella peptídica y secuencia total.

Por último, ante la hipótesis antes descrita de que en el eluido podría encontrarse una forma del PCI Chu sin el aminoácido N-terminal (pGlu1), se procedió a realizar una búsqueda manual de la secuencia: RDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYVG. A través de esta búsqueda lograron identificarse los péptidos de la Figura 3.18.

| Mono MH+ | Dev(Da) | Rango   | Parciales | Secuencia   |
|----------|---------|---------|-----------|---|
| 1499,709 | 0,027   | [1-12]  | 0         | RDPDPICNKPKCK (2 * Carbamidometil (C))                    |
| 2328,897 | 0,047   | [13-31] | 0         | THDDCSGAWFCQACWNSAR (3 * Carbamidometil (C))              |
| 3006,181 | 0,046   | [13-38] | 1         | THDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYV (3 * Carbamidometil (C))        |
| 3809,588 | 0,143   | [1-31]  | 1         | RDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSAR (5 * Carbamidometil (C)) |

**Secuencia identificada: RDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYV**

**Figura 3.18:** Resumen de los péptidos identificados en la huella peptídica y secuencia total.

Se puede concluir entonces, que las masas observadas en la fracción eluida de la cromatografía de afinidad del extracto de Churqueña empleando CPA inmovilizada se corresponden con las siguientes secuencias proteicas de inhibidores de CPA, una de ellas obtenida a través de ARNm desde un brote de papa:

**PCI Chu: QRDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYVG**  
**RDPDPICNKPKCKTHDDCSGAWFCQACWNSARTCGPYVG**



## Discusión

---



## DISCUSIÓN

La síntesis de biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos), el metabolismo intermediario, la comunicación intracelular (por ejemplo, la respuesta inmune) y los procesos catabólicos de remodelación de tejidos, son todos procesos en los que existe una serie secuencial de reacciones químicas que mantienen las funciones esenciales para la vida. La gran mayoría de estas reacciones ocurrirían a muy baja velocidad si no fueran catalizadas por enzimas, y no serían compatibles con las necesidades fisiológicas de un organismo, por lo menos, en las condiciones del planeta Tierra (Copeland 2005). Por este motivo la investigación de moléculas que modulen la actividad de enzimas como las proteasas resulta de gran interés.

El descubrimiento de inhibidores de proteasas de origen vegetal es cada vez más importante y la base estructural de la interacción entre ellos se encuentra bajo continuo estudio (Mosolov VV. 2005, Bateman KS. 2011). El continuo avance en el conocimiento de su acción ha dado lugar a numerosos recientes reportes que expresan su potencial reemplazo de terapias con drogas sintéticas en la farmacología (Atanasov A G. 2015, Fischer 2015). Esperamos que la discusión de este trabajo resulte provechosa para el avance del estudio de esta clase de moléculas.

En la primer parte de este trabajo se caracterizó el extracto crudo de *Solanum tuberosum* grupo andigenum var. Churqueña. Se determinó que existen inhibidores en el extracto frente a enzimas de distintos tipos mecanísticos. Esta versatilidad de inhibidores de proteasas presentes en la papa le otorga la resistencia frente a diferentes proteasas presentes en el sistema digestivo de organismos herbívoros. Con lo cual la presencia de estas moléculas confiere a las papas inmunidad innata frente a distinto tipo de predadores.

Una de las características más representativas de los inhibidores de proteasas de peso molecular inferior a 20 kDa es la estabilidad estructural y funcional a altas temperaturas. Bajo esta premisa, se comprobó la estabilidad térmica de los inhibidores de carboxipeptidasa A a elevadas temperaturas, incluso hasta 100°C. De esta manera, elaboramos una estrategia en la cual se

utilizó este tratamiento como primera etapa de purificación, ya que al eliminar de la muestra otros contaminantes proteicos se logra aumentar la actividad inhibitoria específica frente a la carboxipeptidasa A, proteasa “target” elegida,.

Adicionalmente y en consonancia con el tratamiento térmico, se propuso la inmovilización de proteasas para su uso en cromatografía de afinidad como estrategia alternativa para purificar los inhibidores. El tipo de inmovilización de proteasas para la captura de inhibidores peptídicos utilizado en este trabajo brinda versatilidades que abarcan desde su aplicación en ECs y ECs semipuros generados por tratamiento térmico, hasta el uso asociado y cooperativo con técnicas proteómicas, como es el caso del Intensity Fading-MALDI-TOF MS.

Para la identificación de los inhibidores de proteasas se emplearon herramientas proteómicas. Se realizó la digestión trípica del nuevo inhibidor que fue analizada por PMF-MALDI-TOF MS (peptide mass fingerprinting) y analizada con la herramienta de búsqueda MASCOT, que inicialmente no permitió una identificación total de la molécula.

En una segunda parte de esta tesis, siguiendo con el objetivo de identificar inhibidores de proteasas, se expresaron dos proteínas tipo cisteín-*knot*: StcCI y 5N-StcCI con el objetivo de caracterizarlas bioquímicamente. Aunque estas proteínas se encuentran en bases de datos como inhibidores putativos de metalocarboxipeptidasas, y además existen trabajos como el de (Cavallini C 2011) que han reportado actividad inhibitoria frente a CPA de proteínas homólogas, en este trabajo no pudo determinarse actividad inhibidora de carboxipeptidasas para el StcCI ni para el 5N-StcCI.

La ausencia de actividad inhibitoria podía deberse a un problema con la conformación estructural de las proteínas recombinantes, por lo que se realizó un estudio del plegamiento de las mismas denominado “*folding*” oxidativo. En este estudio no se observó que las proteínas recombinantes tengan la tendencia a adquirir conformaciones diferentes a la de las proteínas purificadas utilizadas en los ensayos enzimáticos. De esta manera se descartó que la ausencia de actividad se deba a una conformación diferente al estado nativo o estable. Sin embargo en base al artículo de (Venhudova 2001) donde se estudió la mutación del PCI en los extremos N y C-terminal, existiría la



probabilidad que agregando uno o dos residuos en el extremo N-terminal la proteína sea activa, aunque parece poco probable dadas las predicciones de la proteína madura en las bases de datos.

Mediante el modelado por homología realizado sobre la secuencia de StcCl se pudo predecir que esta molécula sería incapaz de producir el contacto necesario con el sitio activo de la CPA para producir la inhibición. Las estructuras cristalográficas de los inhibidores de carboxipeptidasas estudiados hasta el momento (NvCl, PCI, TCI, LCI, ACI y SmCl) muestran que todos ellos se orientan de una manera similar hacia el sitio activo. Al alinear estructuralmente estas estructuras al modelo del StcCl se puede ver claramente la incompatibilidad que presenta el StcCl para disponerse espacialmente de la orientación necesaria para interaccionar con la enzima ya sea a través de su extremo N o C-terminal.

StcCl y TCMP-2 poseen exactamente los mismos tres residuos aminoacídicos en su extremo C-terminal; esta región de contacto primario, es la más importante para la estabilización de la interacción entre el inhibidor y la carboxipeptidasa. Observando esto y el modelo obtenido para StcCl, se abren dudas sobre la reproducibilidad de la actividad detectada para el TCMP-2.

La proteína TCMP-2 que posee alta homología con StcCl y 5N-StcCl ha sido descrita como inhibidor de CPA pero también como responsable de efecto antiangiogénico en células de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) (Cavallini C 2011). Como perspectiva a futuro, se puede ensayar este tipo de actividad con StcCl y 5N-StcCl.

Por otro lado, intentando conocer la función de la proteína StcCl se encontró que GM7 es un gen descubierto por (Banfalvi 1996) (número de acceso es U30388.1). Este gen codifica para una proteína idéntica al StcCl. Durante un “screening” de genes involucrados en el proceso de tuberización inducido por el aumento del nivel de sacarosa, Banfalvi y colaboradores detectaron un aumento en la producción del mRNA del GM7. Aún no ha sido descrita una ruta metabólica que describa de qué forma GM7 se encuentra involucrado en este proceso. Por lo tanto no se conoce una función o un proceso específico en el que se hallen involucradas este tipo de moléculas. Podría ser que sean moléculas de reserva.

En una tercera parte del trabajo, se procedió al clonado de un nuevo inhibidor de CPA, PCI Chu. La  $K_i$  es una constante que refleja la afinidad que posee un inhibidor por una enzima, con lo cual PCI Chu posee una menor afinidad por CPA y CPB que el PCI. Las diferencias entre estas dos moléculas radican en su extremo N-terminal. Como ya hemos planteado, el extremo N-terminal se encuentra involucrado en el plegado del PCI, sería posible que la estructura conformacional de PCI Chu posea una disposición que desestabiliza alguno de los contactos entre el PCI y la enzima, ya sea en el sitio primario o secundario de interacción.

Por medio de la espectrometría de masas se lograron identificar en el EC de Churqueña, por PMF MALDI TOF MS/MS o secuenciación de *novio*, dos isoformas del inhibidor de carboxipeptidasas. Una de estas isoformas corresponde al PCI Chu que presenta una glutamina modificada del extremo N-terminal. La presencia de esta modificación post-traducciona en el N-terminal se dedujo gracias a que el PCI Chu recombinante expresado en *E. coli* también posee esta modificación. La otra isoforma encontrada en el EC corresponde al PCI Chu sin un residuo (glutamina modificada) en el extremo N-terminal. A través de la utilización de dos métodos diferentes como son la biología molecular y la espectrometría de masas se han logrado identificar dos nuevas moléculas inhibidoras de carboxipeptidasas.

Las modificaciones de ácido pGlu en el extremo N-terminal han sido develadas tanto en bacterias, como en plantas y humanos. Tanto la existencia de esta modificación en las proteínas como la existencia del metabolito libre, ácido piroglutámico o 5-oxoprolina se encuentran escasamente estudiadas. Estas modificaciones se han encontrado en péptidos neuronales y hormonas que también incluyen los péptidos acumulados en enfermedades de demencia familiar y Alzheimer. A la forma de metabolito libre se le ha asignado a la posible función de osmoprotector o reservorio de glutamato (Kumar 2012).

Los isoinhibidores presentes en papas han sido estudiados por Hass y colaboradores (Hass G. M. 1979) quienes también encontraron isoformas del PCI a las que les faltan uno o dos residuos en el extremo N-terminal de la proteína. Se han realizado estudios de estos isoinhibidores nativos, e incluso mediante mutaciones en inhibidores recombinantes (Marino-Buslje C. 2000) y

no se han observado grandes variaciones entre las  $K_i$  de estas moléculas. A su vez también se encuentra presente la modificación de pGlu en un inhibidor de papa andina el cual posee además mutaciones en algunos de los residuos de contacto secundario (Lufrano D. 2015).

En germen de trigo y tabaco se ha descrito la enzima 5-oxoprolinasa la cual libera el pGlu de una proteína. La  $\gamma$ -glutamyl ciclotransferasa es una enzima que produce la ciclación Gln o Glu, sin embargo, no ha sido encontrada en plantas. Recientemente, ha sido descrita una proteína en *Arabidopsis thaliana* que posee esta función y ejercería un efecto protector de la toxicidad de metales pesados mediante el reciclado de glutamato para mantener la homeostasis de glutatión (Paulose B. 2013).

No es posible asignar una función a la modificación del extremo N-terminal en inhibidores de papas, pero sin embargo los estudios realizados previamente dan una idea de que podrían otorgar protección frente a la degradación de otras enzimas. Además, la liberación de pGlu podría producir un efecto osmoprotector y de reservorio de glutamato.

El trabajo realizado en esta tesis ha abierto un abanico de incógnitas metabólicas y moleculares que giran alrededor de estas miniproteínas de características particulares: actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas, notable estabilidad térmica, alta relación puentes disulfuro/aminoácidos constituyentes, actividades biológicas no asociadas a la función inhibitoria, proteínas de reserva, efectos antiangiogénicos, etc. Dichas moléculas, que rondan una composición de 40 aminoácidos y conservan los puentes disulfuro independientemente de la secuencia aminoacídica, fortalecen el principal vínculo molecular que comparten al evaluar el notable alineamiento estructural que se establece entre ellas.



# **Conclusiones Finales**

---



## CONCLUSIONES FINALES

### Capítulo 1

- Se obtuvieron diferentes extractos crudos a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad “Churqueña”.
- Los tubérculos de *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad Churqueña son fuente de inhibidores de proteasas de diferente tipo mecanístico.
- En el extracto crudo de Churqueña existen inhibidores de carboxipeptidasas que son estables a altas temperaturas incluso hasta 100°C.
- Se diseñaron matrices de afinidad para inmovilizar proteasas diana, que fueron utilizadas para realizar ensayos de *Intensity Fading*, observando que existen moléculas en el extracto de Churqueña que interaccionan con CPA inmovilizada.
- Mediante cromatografía de afinidad con CPA inmovilizada, se purificó una molécula que produce inhibición de CPA y se determinó la masa molecular esta molécula mediante espectrometría de masas.
- Se realizó un estudio mediante PMF-MALDI-TOF MS para determinar la identidad de esta molécula y no se obtuvo identificación en las bases de datos consultadas.

### Capítulo 2

- Se realizó la secuenciación del extremo N-terminal mediante EDMAN de una molécula del extracto de Churqueña tratado térmicamente.

- Se identificaron dos moléculas en bases de datos que poseen el extremo N-terminal determinado mediante la secuenciación, descritas como potenciales inhibidores de metalo-carboxipeptidasas.
- Con el fin de caracterizar estas moléculas, se clonó y expresó de forma recombinante en *E. coli* una de estas dos miniproteínas “*cystine knot*”, StcCI. También se clonó y expresó una versión de esta molécula con cinco residuos adicionales en su extremo N-terminal para evaluar el efecto de esta región en la actividad inhibitoria. Se realizaron ensayos de actividad inhibitoria frente a CPA y CPB de estas moléculas, y no se obtuvo inhibición frente a estas proteasas.
- El estudio de “*folding oxidativo*” muestra que StcCI y 5N-StcCI no adoptan conformaciones estables diferentes de las presentes en las proteínas purificadas utilizadas en los ensayos enzimáticos. Por lo tanto la ausencia de inhibición no se debería a un problema de plegamiento en las proteínas.
- Se determinó que en la familia Solanaceae, *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*, presentan miniproteínas de tipo “*cystine knot*”, tal como TCMP-2 y StcCI, con similitud estructural y de secuencia.
- Mediante el modelado por homología realizado sobre la secuencia de StcCI se pudo predecir que esta molécula sería incapaz de producir el contacto necesario con el sitio activo de CPA para producir la inhibición.
- El rol de la miniproteína StcCI no está relacionado con la inhibición de carboxipeptidasas, tal como han revelado los estudios de *folding oxidativo* y bioinformática.

### Capítulo 3

- A través de la obtención de ARNm de un brote de papa Churqueña, se clonó y expresó de forma recombinante en *E coli*, una molécula (PCI Chu) que



posee actividad inhibidora de CPA y CPB. PCI Chu recombinante presenta valores de  $K_i$  comparables a las del PCI de *Solanum tuberosum tuberosum*.

- Mediante MALDI-TOF MS se determinó que la molécula expresada de forma recombinante presenta una modificación post-traducciona en su extremo N-terminal la cual se podría corresponder con una glutamina modificada formando piroglutamato.
- Por medio de espectrometría de masas, utilizando la técnica PMF-MALDI-TOF-TOF MS/MS o secuenciación de *nov*, se logró identificar en el EC de Churqueña la presencia de dos isoformas de PCI Chu nativo. Una de estas isoformas presenta la misma secuencia que PCI Chu recombinante. Además esta molécula presenta la misma modificación postraducciona de la glutamina del extremo N-terminal que se observó en el PCI Chu recombinante. La otra isoforma encontrada en el EC corresponde al PCI Chu sin un residuo de piroglutamato en el extremo N-terminal.
- *Solanum tuberosum* grupo andigenum variedad Churqueña expresa isoinhibidores como PCI Chu, que están codificados por genes homólogos a aquellos presentes en el genoma de *Solanum tuberosum*, grupo tuberosum.



## Referencias

- Abbenante, G., and Fairlie, D. P. (2005). "Protease inhibitors in the clinic." Med. Chem. **1**: 71-104.
- Alonso-del-Rivero, M., S. A. Trejo, M. Rodriguez de la Vega, Y. Gonzalez, S. Bronsoms, F. Canals, J. Delfin, J. Diaz, F. X. Aviles and M. A. Chavez (2009). "A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases." FEBS J **276**(17): 4875-4890.
- Alvaro, G., R. Fernandez-Lafuente, R. M. Blanco and J. M. Guisan (1990). ""Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*."" Appl Biochem Biotechnol **26**(2): 181-195.
- Arolas, J. L., Aviles, F. X., Chang, J. Y., Ventura, S. (2006). "Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle." Trends Biochem Sci **31**(5): 292-301.
- Arolas, J. L., Lorenzo, J., Rovira, A., Castella, J., Aviles, F. X., Sommerhoff, C. P. (2005). "A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization." J Biol Chem **280**(5): 3441-3448.
- Arolas, J. L., Vendrell, J., Aviles, F. X., Fricker, L. D. (2007). "Metallo-carboxypeptidases: emerging drug targets in biomedicine." Curr Pharm Des **13**(4): 349-366.
- Arolas, J. L. S., L. Lorenzo, J. Bronsoms, S. Aviles, F. X. (2009). "Insights into the two-domain architecture of the metallo-carboxypeptidase inhibitor from the *Ascaris* parasite inferred from the mechanism of its oxidative folding." Biochemistry **48**(34): 8225-8232.
- Arroyo, J. M. S.-M. a. J. V. S. (1998). "Stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on different supports." Progress in Biotechnology **15**.
- Atanasov A G., B. W., Eva-Maria Pferschy-Wenzig, Thomas Linder, Christoph Wawrosch, Pavel Uhrin, Veronika Temml, Limei Wang, Stefan Schwaiger, Elke H. Heiss, Judith M. Rollinger, Daniela Schuster, Johannes M. Breuss, Valery Bochkov, Marko D. Mihovilovic, Brigitte Kopp, Rudolf Bauer, Verena M. Dirsch, and Hermann Stuppnerb (2015). "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review." Biotechnol Adv.: 1582-1614.
- Baldwin (1994). "Protein folding. Matching speed and stability." Nature. **369**(6477): 183-184.
- Banfálvi, Z., Molnar, A., Molnar, G., Lakatos, L., Szabo, L. (1996). "Starch synthesis, and tuber storage protein genes are differently expressed in *Solanum tuberosum* and in *Solanum brevidens*." FEBS Lett **383**(3): 159-164.
- Bártová V., B. J. (2008). "Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice." RES. AGR. ENG. **54**(4): 170–175.
- Bateman KS., J. M. (2011). "Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition." Curr Protein Pept Sci. **5**: 340-347.
- Bayés A. , C.-B. M., Rodríguez de la Vega M., Maskos K., Bode W., Aviles F. X., Jongsma M. A., Beekwilder J., Vendrell J. (2005). "Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46): 16602-16607.
- Beavis, R. C. and B. T. Chait (1989). "Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins." Rapid Commun Mass Spectrom **3**(7): 233-237.

- Berger, S. a. (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." Biochemical and Biophysical Research Communications **27**(2): 157-162.
- Blanco-Aparicio C, M. A. M., Ester Fernández-Salas, Marsha L. Frazier, José M. Ma, Enrique Querol, Francesc X. Avilés and Rafael de Llorens (1998). "Potato Carboxypeptidase Inhibitor, a T-knot Protein, Is an Epidermal Growth Factor Antagonist That Inhibits Tumor Cell Growth." The Journal of Biological Chemistry **273**: 12370-12377.
- Bode W., H. R. (1992). "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases." Eur J Biochem **204**: 433-451.
- Bode W., H. R. (2000). "Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction." Biochim Biophys Acta. **1477**((1-2)): 241-252.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bronsoms S., P.-U. D., Gabrijelcic-Geiger D., Sanglas L., Aviles FX., Santoro J., Sommerhoff CP., Arolas JL. (2011). "Oxidative folding and structural analyses of a Kunitz-related inhibitor and its disulfide intermediates: functional implications." J Mol Biol. **414**(3): 427-441.
- Brzin, J. K., M. (1995). ""Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions"." Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **13**: 420- 467.
- Cavallini C , T., DeganM , DelvaP , Molesini B , Minuz P and Pandolfini T (2011). "Anti-angiogenic effects of two cystine-knot miniproteins from tomato fruit." British Journal of Pharmacology **162** (1261): 1261–1273.
- Copeland, R. A. (2005). Evaluation of Enzyme Inhibitors in drug discovery (Aguide for Medicinal Chemist and Pharmacologists), John Wiley & Sons, Inc.
- Covalada, G., Alonso del Rivero, M. A. , Chavez, M. A., Aviles, F. X., Reverter, D. (2012). "Crystal structure of novel metallocarboxypeptidase inhibitor from marine mollusk *Nerita versicolor* in complex with human carboxypeptidase A4." J Biol Chem **287**(12): 9250-9258.
- Chang, J. (1994). "Controlling the speed of hirudin folding." Biochem J.: 643-650.
- Chang, J. (1996). "The disulfide folding pathway of tick anticoagulant peptide (TAP), a Kunitz-type inhibitor structurally homologous to BPTI." Biochemistry **35**(36): 11702-11709.
- Chang, J. S., P; Ramseier, U; Lai PH. (1995). "The disulfide folding pathway of human epidermal growth factor." J Biol Chem. **270**(16): 9207-9216.
- Chang, R. J. Y. (2011). Folding of Disulfied proteins, Springer.
- Chatrenet B, C. J. (1993). "The disulfide folding pathway of hirudin elucidated by stop/go folding experiments." J Biol Chem. **268**(28): 20988-20996.
- Chen, Y. W., Huang, S. C., Lin-Shiau, S. Y., & Lin, J. K. (2005). "Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. ." Carcinogenesis **26**: 1296–1306.
- Chiche L, H. A., Gelly JC, Gracy J, Chau PT, Ha PT, Hernandez JF, Le-Nguyen D: ( 2004). " Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. ." Curr Protein Pept Sci **5**: 341-349.
- Choi SJ, P. R., Guillaume C, Deregnacourt C, Delarbre C, Ojcius DM, Montagne JJ, Celerier ML, Phelipot A, Amiche M, Molgo J (2004). " Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*." FEBS Lett. **572**: 109-117.

- Dietrich MA, S. M., Karol H, Adamek M, Steinhagen D, Hejmej A, Bilińska B, Ciereszko A. (2016). "Serine protease inhibitor Kazal-type 2 is expressed in the male reproductive tract of carp with a possible role in antimicrobial protection." Fish Shellfish Immunol. : S1050-4648(1016)30736-30737.
- Dill KA, C. H. (1997). "From Levinthal to pathways to funnels." Nat Struct Biol. **1**: 10-19.
- Dill KA, M. J. (2012). "The protein-folding problem, 50 years on." Science **23**(338): 1042-1046.
- Dobson, C. M. (2001). "The structural basis of protein folding and its links with human disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1406): 133-145.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." Nature **426**(6968): 884-890.
- Dunse KM, S. J., Lay FT, Gaspar YM, Heath RL, Anderson MA (2010). "Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field." PNAS.
- Faiguenbaum, H. (1988). Papa. Producción de cultivos en Chile. Cereales, leguminosas e industriales.
- Fischer, M. K., M. Kastilan, R. Muth, J. Gebhardt, C. (2015). "Novel in vitro inhibitory functions of potato tuber proteinaceous inhibitors." Mol Genet Genomics **290**(1): 387-398.
- G.M. Clore, A. M. G., M. Nilges, C.A. Ryan (1987). Biochemistry **26**: 8012-8023.
- G.M. Hass, H. A., D.G. Grahn, H. Neurath (1976). "Carboxypeptidase Inhibitor from potatoes. The effects of chemical modification on inhibitory activity." Biochemistry **15**: 93-100.
- García-Fernández R., E. S., A. del Monte, M. Alonso del Rivero, Y. Guerra, M. A. Chávez. (2009). "Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico." Revista Cubana de Física(26): 76-82.
- Gardell, S. J. e. a. (1988). "A novel rat carboxypeptidase, CPA2: characterization, molecular cloning, and evolutionary implications on substrate specificity in the carboxypeptidase gene family." Journal of Biological Chemistry **263**(33): 17828-17836.
- Gelly JC, G. J., Kaas Q, Le-Nguyen D, Heitz A, Chiche L (2004). "The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold." Nucleic Acids Res **32**: 156-159.
- Gong, H., Zhou, J., Liao, M., Hatta, T., Harnnoi, T., Umemiya, R., Inoue, N., Xuan, X., Fujisaki, K. (2007). "Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick *Haemaphysalis longicornis*." J Insect Physiol **53**(10): 1079-1087.
- Gonzalez, C., Neira, J. L., Ventura, S., Bronsoms, S., Rico, M., Aviles, F. X. (2003). "Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by 1H and 15N NMR." Proteins **50**(3): 410-422.
- Green M. R., a. S. J. (2012). Molecular cloning. A laboratory manual. Chapter 7: Polymerase Chain Reaction. Chapter 7. Protocol 10: Rapid Amplification of sequences from the 3Ends RNAs: 3-RACE., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guisan, J. M., Ed. (2006). Immobilization of Enzymes and Cells, Human Press.
- Guisan, J. M., A. Bastida, C. Cuesta, R. Fernandez-Lufuente and C. M. Rosell (1991). "Immobilization-stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels." Biotechnol Bioeng **38**(10): 1144-1152.
- Hartl M, G. A., Kaur H, Baldwin IT (2011). "The multiple functions of plant serine protease inhibitors: defense against herbivores and beyond." Plant Signal Behav. **7**: 1009-1011.

- Hass G. M., a. J. E. D., Donald J. Makus, Clarence A. Ryan (1979). "Purification and Characterization of the Carboxypeptidase Isoinhibitors from Potatoes." Plant Physiol. **64**(6): 1022-1028.
- Hass, G. M. a. D., J.E. (1979). "Purification and Characterization of the Carboxypeptidase Isoinhibitors from Potatoes." Plant Physiol **64**: 1022-1028
- Hass, G. M. a. R., C.A. (1981). "Carboxypeptidase inhibitor from potatoes." Methods in Enzymology **80**: 778-791.
- Hawkes, J. G. (1990). The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources.
- Heitz A, A. O., Le-Nguyen D, Diederichsen U, Hernandez JF, Gracy J, Kolmar H, Chiche L: ( 2008). " Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. ." BMC Struct Biol **8**: 54.
- Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." Methods Enzymol **193**: 280-295.
- Hooper NM. (1996). The biological roles of zinc and families of zinc metalloproteases. Zinc metalloproteases in health and disease. London.
- Hughes C., M. B., Lajoie GA. (2010). "De novo sequencing methods in proteomics." Methods Mol Biol.: 105-121.
- Jackson PJ, M. J., Yang YK, Thompson DA, Chai B, Gantz I, Barsh GS, Millhauser GL (2002). "Design, pharmacology, and NMR structure of a minimized cystine knot with agouti-related protein activity. ." Biochemistry **41**: 7565-7572.
- Jedinak, A., & Maliar, T. (2005). "Inhibitors of proteases as anticancer drugs." Neoplasma **52**: 185–192.
- Jorge M. Vivanco, E. C., Víctor M. Loyola-Vargas y Héctor E. Flores ( 2005). "Mecanismos químicos de defensa en las plantas."
- Kennedy, A. R., & Wan, X. S. (2002). "Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells." Prostate **50**: 125–133.
- Kimura RH, C. Z., Gambhir SS, Cochran JR (2009). "Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. Cancer Res " **69**: 2435-2442.
- Kolmar, H. (2009). "Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins." Current Opinion in Pharmacology(9): 608–614.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., Otlewski, J. (2003). "Canonical protein inhibitors of serine proteases." Cell Mol Life Sci **60**(11): 2427-2444.
- Kumar, A. a. B. A. K. (2012). "Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite." CURRENT SCIENCE **102**(2).
- Laskowski M Jr, K. I. (1980). "Protein inhibitors of proteinases." Annu Rev Biochem **49**: 593-626.
- Laskowski, R. (2001). "PDBsum: summaries and analyses of PDB structures." Nucleic Acids Res. : 221-222.
- Laskowski, R. A. M., M W; Moss, D S; Thornton, J M (1993). "PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. ." J. App. Cryst. **26**: 283-291.
- Lengauer, T., Rarey, M. (1996). "Computational methods for biomolecular docking." Curr Opin Struct Biol. **3**: 402-406.

- Losso, J. N. (2008). "The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor (vol 48, pg 94, 2008)." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **48**(8): 798-798.
- Lourenço J D, N. L. P., OlivoClarice R. , Duran Adriana, Almeida Francine M., Arantes Petra M. M., Prado Carla M., Leick Edna Aparecida, Tanaka Aparecida S. , Martins Milton A., Sasaki Sergio D., Lopes Fernanda D. T. Q. S. ( 2014). "A Treatment with a Protease Inhibitor Recombinant from the Cattle Tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) Ameliorates Emphysema in Mice." PLOS ONE **9**(6): e98216.
- Lufrano D., C. J., Garcia-Pardo J., Fernandez Alvarez R., Tort O., Tanco S., Avilés F. X., Lorenzo J., Obregón W. D. (2015). "Biochemical characterization of a new carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes." Phytochemistry.
- Luk K C, K. V., Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski J Q, Lee V M.-Y. (2012). "Pathological  $\alpha$ -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice." Science **338**(6109): 949-953.
- Lukasiuk K, W. G., Kaczmarek L. (2011). "Extracellular proteases in epilepsy." Epilepsy Res. **96**(3): 191-206.
- Lyons P.J. & Fricker L.D. (2011). "Carboxypeptidase O is a glycosylphosphatidylinositol-anchored intestinal peptidase with acidic amino acid specificity." Journal of Biological Chemistry **286**(45): 39023-39032.
- Marino-Buslje C., V. G., Molina M. A., Oliva B., Jorba X., Canals F., Aviles F. X. and Querol E. (2000). "Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A. A mutagenesis analysis." Eur. J. Biochem. **267**: 1502-1509.
- Martineau B, M. K., Houck CM: (1991). "Regulation of metallocarboxypeptidase inhibitor gene expression in tomato. ." Mol Gen Genet **228**: 281-286.
- Massote PD, P. A., Fonseca CG, Prado MA, Guimaraes AL, Massensini AR, Gomez MV: (2008). "Protective effect of retinal ischemia by blockers of voltage-dependent calcium channels and intracellular calcium stores." Cell Mol Neurobiol **28**: 847-856.
- Milan, D. (1987). Tomo I. Descripción de plantas cultivadas. . Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. B. A. ACME S.A.C.I.
- Montes, T., V. Grazu, F. Lopez-Gallego, J. A. Hermoso, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente. (2006). "Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers." Biomacromolecules **7**(11): 3052-3058.
- Morrison, J. F. (1982). "The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions." Trends Biochem Sci **7**(3): 102-105.
- Mosolov VV., V. T. (2005). "Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. ." Appl Biochem Microbiol. **41**: 227-246.
- Motulsky, H. P. S. G. G. S., San Diego. (2007). Prism 5 Statistics Guide. GraphPad Software.
- Nagase., H. (1996). "In Zinc Metalloproteinases in Health and Disease. Hooper NM, ed." Taylor and Francis.
- Nagashima M, W. M., Wang M, Zhao L, Light D R, Pagila R, Morser J, Verhallen P (2000). "An Inhibitor of Activated Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Potentiates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Thrombolysis in a Rabbit Jugular Vein Thrombolysis Model." Thromb Res **98**(4): 333-342.

- Neuhoff, V., N. Arold, et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-262.
- Neurath, H., Walsh, K. A. (1976). "Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review)." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 3825-3832.
- Normant, E., Martres, M. P., Schwartz, J. C., Gros, C. (1995). "Purification, cDNA cloning, functional expression, and characterization of a 26-kDa endogenous mammalian carboxypeptidase inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12225-12229.
- Obregon, W. D., C. S. Liggieri, S. A. Trejo, F. X. Aviles, S. E. Vairo-Cavalli and N. S. Priolo (2009). "Characterization of papain-like isoenzymes from latex of *Asclepias curassavica* by molecular biology validated by proteomic approach." Biochimie **91**((11-12)): 1457-1464.
- Obregon, W. D., C. S. Liggieri, S. R. Morcelle, S. A. Trejo, F. X. Aviles and N. S. Priolo (2009). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases." Protein Pept Lett **16**(11): 1323-1333.
- Obregón, W. D., Ghiano N. , Tellechea M., Cisneros J. S. , Lazza C. M., López L. M.I., Avilés F. X. (2012). "Detection and characterisation of a new metallocarboxypeptidase inhibitor from *Solanum tuberosum* cv. Desirée using proteomic techniques." Food Chemistry **133**(4): 1163-1168.
- Ochoa, C. M. (1990). "The Potatoes of South America: Bolivia." Cambridge University Press: 535.
- Ochoa, C. M. (1999). "Las papas de sudamerica: Peru (Parte I)." International Potato Center, Lima: 1036.
- Oliva, M. L., Souza-Pinto, J. C., Batista, I. F., Araujo, M. S., Silveira, V. F., Auerswald, E. A. (2000). "Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. ." Biochim Biophys Acta **1477**: 1464–1474.
- Otlewski J. , J. F., Zakrzewska M. and Oleksy A. (2005). "The many faces of protease–protein inhibitor interaction." The EMBO Journal **24**: 1303-1310.
- Padhorny, D. K., Andrey; Zerbe, Brandon S; Porter, Kathryn A.; Xia, Bing; Mottarella, Scott E.; Kholodov, Yaroslav; Ritchie, David W.; Sandor Vajda; Dima Kozakov (2016). "Protein-protein docking by fast generalized Fourier transforms on 5D rotational manifolds." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(30): E4286 - E4293.
- Pallaghy PK, N. K., Craik DJ, Norton RS ( 1994). " A common structural motif incorporating a cystine knot and a triplestranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides." Protein Sci **3**: 1833-1839.
- Pallares, I., Bonet, R., Garcia-Castellanos, R., Ventura, S., Aviles, F. X., Vendrell, J., Gomis-Ruth, F. X. (2005). "Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 3978-3983.
- Paulose B. , S. C., Joshua Coomey, Ha-il Jung, Olena Vatamaniuk, and Om Parkash Dhankher, (2013). "A  $\gamma$ -Glutamyl Cyclotransferase Protects Arabidopsis Plants from Heavy Metal Toxicity by Recycling Glutamate to Maintain Glutathione Homeostasis[C][W]." Plant Cell. **11**: 4580-4595.
- Perez-Pinzon MA, Y. M., Sun GH, Kunis DM, Steinberg GK (1997). "SNX-111, a novel, presynaptic N-type calcium channel antagonist, is neuroprotective against focal cerebral ischemia in rabbits." J Neurol Sci **153**: 25-31.



- Pettersen, E., Goddard TD., Huang CC., Couch GS., Greenblatt DM., Meng EC., Ferrin TE. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem. **13**: 1605-1612.
- Pimentel C, C. S., Chagot B, Guette C, Camadro JM, Darbon H (2006). "Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against Plasmodium falciparum. ." Protein Sci **15**: 628-634.
- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M., Lopez-Otin, C. (2003). "Human and mouse proteases: A comparative genomic approach." Nature Reviews Genetics **4**(7): 544-558.
- Quesada V., e. a. (2009). "The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis." Nucleic acids research **37**: .D239-D243.
- Ramachandran, G., Sasisekharan, V. (1968). "Conformation of polypeptides and proteins." Adv Protein Chem **23**: 283-438.
- Ramírez, H. (2003). "TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS PARA RESISTENCIA A INSECTOS."
- Rau, J., Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. (2007). "Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis." J Thromb Haemost. **1**: 102-115.
- Rawlings N. D. , B. A. J. a. F. R. (2016). "Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Research **44**: D343-D350.
- Rawlings, N. D., *et al* (2014). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Res **42**: D503-D509.
- Rees, D. C. and W. N. Lipscomb (1982). "Refined Crystal-Structure of the Potato Inhibitor Complex of Carboxypeptidase-a at 2.5-Å Resolution." Journal of Molecular Biology **160**(3): 475-498.
- Reverter, D., Fernandez-Catalan, C., Baumgartner, R., Pfander, R., Huber, R., Bode, W., Vendrell, J., Holak, T. A., Aviles, F. X. (2000). "Structure of a novel leech carboxypeptidase inhibitor determined free in solution and in complex with human carboxypeptidase A2." Nat Struct Biol **7**(4): 322-328.
- Reverter D, V. J., Canals F, Horstmann J, Avilés FX, Fritz H, Sommerhoff CP. (1998). "A carboxypeptidase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*. Isolation, sequence analysis, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization." J Biol Chem **273**(49): 32927-32933.
- Ryan, C. A. (1990). "Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens" " Annu.Rev.Phytopath. **28**: 425-449.
- Ryan, H. (1980). "CLEAVAGE OF THE CARBOXYPEPTIDASE INHIBITOR FROM POTATOES BY CARBOXYPEPTIDASE A." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS **97**(4): 1481-1486.
- Ryoko, M.-H. (2015). "Diversity of potato genetic resources." Breeding Science **65**: 26-40.
- S.L. Lin, R. N. (1995). Nat. Struct. Biol. **2**: 835-837.
- Sajid, M. and J. H. McKerrow (2002). "Cysteine proteases of parasitic organisms." Mol Biochem Parasitol **120**(1): 1-21.
- Sali&Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J. Mol. Biol. **234**: 779-815.

- Sanglas, L., Aviles, F. X., Huber, R., Gomis-Ruth, F. X., Arolas, J. L. (2009). "Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1743-1747.
- Siemens J, Z. S., Piskorowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, King D, Julius D (2006). "Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain." Nature **444**: 208-212. .
- Silverman, G., Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. (2001). "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." J Biol Chem **36**(276): 33293-33296.
- Sitjà-Arnau M, M. A. M., Carmen Blanco-Aparicio, Laura Ferrer-Soler, Julia Lorenzo, Francesc X. Avilés, Enrique Querol, Rafael de Llorens (2005). "Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker." Cancer Letters **226**: 169–184.
- Soler, G. A., Bastida, et al. (1997). "Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents." Biochim Biophys Acta. **1339**(1): 167-175.
- Spooner D.M., J. N., G. Trujillo, M. Del Rosario Herrera, F. Guzmán and M. Ghislain (2007). "Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 19398-19403.
- Stratton C. F., N. D. J., Tan D. S. (2015). "Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **25**: 4802-4807.
- Suau T., Á. G., Benaiges M. D., & López-Santín Josep (2009). "Performance of an immobilized fuculose-1-phosphate aldolase for stereoselective synthesis " Biocatalysis and Biotransformation **27**(2): 136-142.
- Tanco S., e. a. (2013). "Proteome-derived peptide libraries to study the substrate specificity profiles of carboxypeptidases." Molecular & cellular proteomics : MCP **12**(8): 2096-2110.
- Tanco S., Z. X., Morano C., Aviles F. X., Lorenzo J., Fricker L. D. (2010). "Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing." J Biol Chem **285**(24): 18385-18396.
- Terra, W. R. y. F., C. (2005). Biochemical of digestion. Comprehensive Molecular Insect Science.
- Thornberry, N. A. a. L., Y. (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**: 1312-1316.
- Trow, W. K., A. R. eds. (1993). ""Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents"." Plenum Publishing Corp.
- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 785-799.
- Uversky V. N. , J. R. G., Anthony L. Fink (2000 ). "Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions?" Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **41**(3): 415–427.
- Vendrell, J., Querol, E., Aviles, F. X. (2000). "Metallo-carboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 284-298.

- Vendrell, J. A., F.X., (1999). Carboxypeptidases. Proteases: new perspectives. Basel, Birkhauser, .
- Venhudova, G. C., F. Querol, E. Aviles, F. X. (2001). "Mutations in the N- and C-terminal tails of potato carboxypeptidase inhibitor influence its oxidative refolding process at the reshuffling stage." J Biol Chem **276**(15): 11683-11690.
- Villanueva J, C. F., Prat S, Ludevid D, Querol E, Avilés F X (1998). "Characterization of the wound-induced metallocarboxypeptidase inhibitor from potato cDNA sequence, induction of gene expression, subcellular immunolocalization and potential roles of the C-terminal propeptide." **440**(1-2): 175–182.
- Villanueva J., Y. O., Querol E, Serrano L, Aviles FX. (2003). "Identification of protein ligands in complex biological samples using intensity-fading MALDI-TOF mass spectrometry." Anal Chem. **75**(14): 3385-3395.
- Wang CK, H. S., Martin JL, Sjogren T, Hajdu J, Bohlin L, Claeson P, Goransson U, Rosengren KJ, Tang J, Tan NH (2009). "Combined X-ray and NMR analysis of the stability of the cyclotide cystine knot fold that underpins its insecticidal activity and potential use as drug scaffold." J Biol Chem **284**: 10672-10683. .
- Werle M, K. K., Kolmar H, Bernkop-Schnurch A (2007). " Evaluation and improvement of the properties of the novel cystine-knot microprotein McoEeTI for oral administration." Int J Pharm **332**: 72-79. .
- Westergaard, J. L., C. Hackbarth, M. W. Treuhaft and R. C. Roberts (1980). "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures." J Immunol Methods **34**(2): 167-175.
- Wilczynski AM, J. C., Haskell-Luevano C (2005). "Current trends in the structure–activity relationship studies of the endogenous agouti-related protein (AGRP) melanocortin receptor antagonist." Med Res Rev **25**: 545-556.
- Williams JA, D. M., Heavner JE: (2008). "Ziconotide: an update and review. ." Expert Opin Pharmacother **9**: 1575-1583.
- Yanes, O., Aviles, F. X., Roepstorff, P., Jorgensen, T. J. (2007). "Exploring the "intensity fading" phenomenon in the study of noncovalent interactions by MALDI-TOF mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **18**(2): 359-367.
- Yanes, O., J. Villanueva, E. Querol and F. X. Aviles (2007). "Detection of non-covalent protein interactions by 'intensity fading' MALDI-TOF mass spectrometry: applications to proteases and protease inhibitors." Nat Protoc **2**(1): 119-130.
- Yanes, O., Villanueva J. , Querol E. and Aviles F. X. (2005). "Functional screening of serine protease inhibitors in the medical leech *Hirudo medicinalis* monitored by intensity fading MALDI-TOF MS." Mol Cell Proteomics **4**(10): 1602-1613.
- Yu B, M. G. (2007). "Chemical disulfide mapping identifies an inhibitor cystine knot in the agouti signaling protein." FEBS Lett. **581**: 5561-5565.
- Yust, M., J. Pedroche, M. Alaiz, J. Giron-Calle, J. Vioque, C. Mateo, J. M. Guisan, F. Millan and R. Fernandez-Lafuente (). " (2007). "Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from flavourzyme." J Agric Food Chem **55**(16): 6503-6508.
- Zhang H, Y. Y., Yang H, Wang X, Kang Z, Li Y, Li G, Wang Y. (2012). "Molecular dynamics and free energy studies on the carboxypeptidases complexed with peptide/small molecular inhibitor: mechanism for drug resistance." Insect Biochem Mol Biol. **42**(8): 583-595.